

**α 1 - KETTE VON RATTENKOLLAGEN:
C-TERMINALE STRUKTUREN UND IHRE
SEROLOGISCHE AKTIVITÄT**

Michael Stoltz

München

1972

α 1-KETTE VON RATTENKOLLAGEN: C-TERMINALE STRUKTUREN
UND IHRE SEROLOGISCHE AKTIVITÄT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Michael Stoltz
aus
Aschersleben

M ü n c h e n 1 9 7 2



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1972

MEINER FRAU

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1970 bis Juli 1972 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Kühn

danke ich sehr herzlich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die mir gewährte wohlwollende Förderung und Unterstützung.

Herrn Dr. R. Timpl

möchte ich ganz besonders für seine immerwährende Bereitschaft und Tatkraft sowie für zahlreiche wertvolle Diskussionen danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für Anregungen und Gefälligkeiten.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
A. EINLEITUNG	1
B. AUFGABENSTELLUNG	6
C. ERGEBNISSE	7
I. STRUKTURUNTERSUCHUNGEN	7
C.I.1. Isolierung und Charakterisierung der α 1-Ketten von Rattenkollagen aus Haut, Sehne und Knochen	7
C.I.2. Isolierung und Vergleich von α 1-CB6 aus Haut- und Sehnenkollagen	12
C.I.3. Nachweis des nichthelicalen Bereiches am α 1-CB6	17
C.I.4. C-terminale Struktur des α 1-CB6 aus NLK von Rattenhaut	22
C.I.5. Das N-terminale Ende der α 1-Kette von Rattenhautkollagen	30
C.I.6. Die nichthelicalen Bereiche der α 1-Kette von Rattenknochenkollagen	35
C.I.7. Diskussion	37
II. IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	42
C.II.1. Charakterisierung der Spezifität der Immunantwort des Kaninchens gegen Ratten- haut-NLK durch passive Hämagglutination	42
C.II.2. Strukturelle Untersuchungen der antigenen Determinante an α 1-CB6	46
C.II.3. Immunogene und tolerogene Eigenschaften der antigenen Determinante an α 1-CB6	50
C.II.4. Diskussion	53
D. ZUSAMMENFASSUNG	57
E. EXPERIMENTELLER TEIL	60
F. LITERATURVERZEICHNIS	72

A B K Ü R Z U N G E N

NLK	Neutralsalzlösliches Kollagen
$\beta 11$	Zwei kovalent gebundene $\alpha 1$ -Ketten
$\beta 12$	Kovalent gebundene $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette
$\alpha 1$ -CB6	Peptid der $\alpha 1$ -Kette, erhalten nach Bromcyanspaltung (vgl. Abb. 1.)
$\alpha 1$ -CB6-C2	Chymotryptisches Peptid von $\alpha 1$ -CB6
C2-T5	Tryptisches Peptid von $\alpha 1$ -CB6-C2
CM-Cellulose	Carboxymethyl-Cellulose
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tris	(Trishydroxymethyl)-aminomethan
AD	Antigene Determinante
BAPN	β -Aminopropionitril-Fumarat
Ig	Immunglobulin

A. EINLEITUNG

Kollagen ist neben Elastin und den Keratinen das wichtigste Skleroprotein des tierischen Organismus. Es bildet den Hauptbestandteil der Hauteiweiße, des straffen Bindegewebes (Sehnen, Fascien, Bänder), sowie der organischen Grundsubstanz von Knorpel, Knochen und Zähnen. Im Säugetierorganismus macht es ein Drittel des gesamten Körperproteins aus.

Das Kollagenmolekül vom Typ I, das in Vertebraten am häufigsten auftritt, besteht aus drei etwa 1050 Aminosäuren langen Polypeptidketten, zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette. Sie sind, durch Wasserstoffbrücken verfestigt, um eine gemeinsame Achse zu einer Rechtsschraube, der Tripelhelix, verdreht. Das stäbchenförmige Molekül hat eine Länge von 2900 Å, einen Durchmesser von 14 Å und ein Molekulargewicht von 285 000. Die Kollagenstruktur wird heute nach dem Modell von Rich und Crick (1), verfeinert durch Yonath und Traub (2), beschrieben.

Diese Moleküle lagern sich im extrazellulären Raum zu Fibrillen zusammen, gegen die Nachbarn jeweils um ein Viertel der Länge versetzt. Die Fibrillen vernetzen durch kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen und gehen damit vom löslichen in den unlöslichen Zustand über. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten Kühn und Mitarbeiter (3) drei verschiedene Typen der Quervernetzung nachweisen. Die "head-to-tail"-Bindung verknüpft die Moleküle über ihre ungleichen Enden in einem schmalen Endbereich. Die "side-to-side"-Bindung fixiert die Moleküle seitlich und damit die Viertelversetzung. Die "end-to-end"-Bindung vernetzt gegeneinander nicht versetzte Moleküle im dreidimensionalen Gebilde über ihre gleichen Enden.

An allen diesen Quervernetzungen sind bestimmte Lysin-, bzw. Hydroxylysinreste beteiligt. Der vorbereitende Schritt ist in jedem Fall die Oxidation mindestens eines der beteiligten Lysin- bzw. Hydroxylysinreste zum jeweiligen ϵ -Aldehyd. Dieser reagiert entweder mit der Aminogruppe eines unveränderten Lysins, bzw. Hydroxylysins unter Bildung einer Schiffschen Base oder in einer Aldolkondensation mit einem weiteren Aldehyd. Die dabei entstehenden Verbindungen sind von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert worden (4). Daneben konnte in jüngster Zeit von Tanzer (5) die Beteiligung von Histidin an der Quervernetzung (in kovalenter Bindung an ein Aldolprodukt oder eine Schiffsche Base) nachgewiesen werden.

Zur Charakterisierung der 1050 Aminosäuren langen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten und für die Ermittlung der Primärstruktur hat sich die Spaltung der Ketten mit Bromcyan (BrCN) als die geeignete Methode erwiesen. Die Reihenfolge der dabei entstehenden BrCN-Peptide ist in Abb. 1. angegeben.

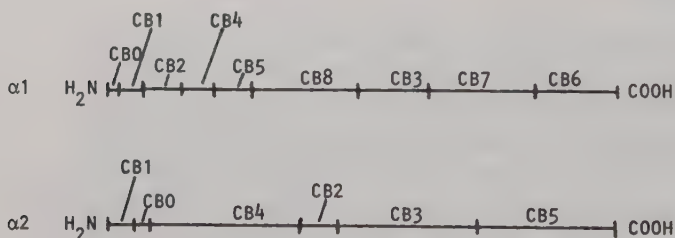


Abb.1. Schema der BrCN-Peptide der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Rattenkollagen (8), (9). Die Bezeichnung der Peptide ist aufgrund einer Ionenaustausch-Chromatographie festgelegt worden (4).

Die genauere Untersuchung der terminalen BrCN-Peptide führte zum Nachweis von nichthelicalen Bereichen. Diese Regionen besitzen zwei besondere Strukturmerkmale. Sie weisen nicht an jeder dritten Stelle Glycin auf, eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer tripelhelicalen Struktur. Weiterhin enthalten sie einen oxidierbaren Lysinrest, der an der Quervernetzung teilnimmt. Die nichthelicalen Bereiche an beiden Enden der Ketten sind also essentiell für die Quervernetzung. Die gilt für den N-Terminus von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette (4) und für den C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette (6), (7).

Die N-terminalen nichthelicalen Bereiche von beiden Ketten sind schon seit längerem von verschiedenen Spezies auch in ihrer Sequenz bekannt (4). Sie umfassen 16 Aminosäuren für die $\alpha 1$ -Kette und 11 Aminosäure bei der $\alpha 2$ -Kette. Erst relativ spät konnte für Kalbshautkollagen eine nichthelicale Region auch am C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette nachgewiesen werden. Vor kurzem wurde die Sequenz dieses Bereiches am $\alpha 1$ -CB6 aus Kalbshautkollagen ermittelt (10), (11). Hier sind es 25 von den 217 Aminosäuren des $\alpha 1$ -CB6, die die tripelhelicale Struktur nicht aufweisen. Bei der Isolierung des C-terminalen nichthelicalen Bereiches hat es sich als schwierig erwiesen, diese Strukturen in voller Länge zu erhalten. Sie werden vermutlich durch Gewebsproteasen abgespalten, die bei der Zerkleinerung des Gewebes freigesetzt werden.

Die nichthelicalen Bereiche sind auch für die immunogenen, d.h. antikörperauslösenden Eigenschaften des Kollagens von Bedeutung. Schon 1964 konnten Schmitt et al. nachweisen, daß durch Proteasebehandlung, die die Tripelhelix nicht zerstört, ein großer Teil der antigenen Spezifität des Kollagenmoleküls zerstört wird (12). In neueren Untersuchungen konnte dieses Ergebnis durch genaue Lokalisierung von antigenen Determinanten auf BrCN-Peptiden eindeutig belegt werden:

Antigene Determinanten wurden sowohl am N-Terminus wie am C-Terminus von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette bei verschiedenen Spezies nachgewiesen und lokalisiert (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19). In diesen terminalen Bereichen sind die Tyrosinreste des Kollagenmoleküls konzentriert, und bis auf eine Ausnahme ist an allen bisher in ihrer Struktur bekannten antigenen Determinanten des Kollagens ein Tyrosinrest beteiligt (17), (18), (19).

Untersuchungen über immunologische Eigenschaften des Kollagens gewinnen in letzter Zeit zunehmend an Interesse. Schon seit einiger Zeit ist lyophilisierte Dura mater vom Menschen in Verwendung (20), (21); sie wird heutzutage an sehr vielen Kliniken Europas bei Nerventransplantationen für die Einbettung des eingesetzten Nervenstranges verwendet (22). Hierzu, bzw. bei etwaigen Komplikationen ist es in erster Linie wichtig zu wissen, unter welchen Bedingungen Kollagen eine Immunantwort auslöst. Andererseits ist es bedeutungsvoll, die Bereiche des Moleküls in ihrer Struktur zu charakterisieren, die für die Auslösung dieser Immunantwort verantwortlich sind. Weiterhin können mit Antikörpern gegen Kollagen Beiträge zur Strukturermittlung geleistet werden.

Die strukturellen und immunogenen Eigenschaften der N-terminalen Enden von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette verschiedener Spezies sind eingehender untersucht als die C-terminalen Enden (4). Für den C-Terminus konnte bisher nur bei der $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen ein nichthelicaler Bereich nachgewiesen und in seiner Sequenz ermittelt werden (10), (11). Bei dem sehr gut untersuchten Rattenkollagen konnte ein solcher Bereich bisher nicht nachgewiesen werden. Es ist nicht klar, ob diese C-terminale nichthelicale Region ein allgemeines Strukturmerkmal aller Kollagenmoleküle ist.

Wie mit Kaninchenserum gegen NLK von Rattenhaut gezeigt werden konnte, weist das $\alpha 1$ -CB6 eine wichtige antigene Determinante auf (15), (23). Diese Determinante ist im Gegensatz zu der entsprechenden Kalbsdeterminante unter Bedingungen, die das native Kollagenmolekül intakt läßt, mit Pronase sehr schwer zu zerstören. Die Determinante am $\alpha 1$ -CB6 von Kalbshautkollagen konnte bereits in einer Hexapeptidsequenz im nichthelicalen Bereich lokalisiert werden (19). Dagegen ist über Struktur und Lage der AD am $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut-NLK nichts bekannt.

B. A U F G A B E N S T E L L U N G

Ausgehend von der Bedeutung der nichthelicalen Bereiche für die Quervernetzung und die immunogene Aktivität sollten diese Strukturen in der Rattenkollagen- $\alpha 1$ -Kette charakterisiert werden. Die Klärung dieser Frage sollte einerseits die allgemeine Natur der C-terminalen nichthelicalen Regionen beweisen, andererseits als Grundlage für weitergehende immunologische Untersuchungen dienen.

Die in der vorliegenden Arbeit gestellten Aufgaben lassen sich in fünf Punkten zusammenfassen:

1. Nachweis eines C-terminalen nichthelicalen Bereiches an der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen.
2. Effekt der Extraktion auf die nichthelicalen Strukturen am C-Terminus und am N-Terminus der $\alpha 1$ -Kette.
3. Untersuchungen über mögliche Gewebeunterschiede im $\alpha 1$ -CB6 von Rattenkollagen aus Haut, Schwanzsehne und Knochen, auch im Hinblick auf ihren Quervernetzungsstatus.
4. Charakterisierung der Struktur der antigenen Determinante auf dem $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut-NLK.
5. Die immunogene Aktivität dieser antigenen Determinante und der mögliche Einfluß der Konformation auf die Immunogenität.

C. E R G E B N I S S E

I. STRUKTURUNTERSUCHUNGEN

C.1.1. Isolierung und Charakterisierung der $\alpha 1$ -Ketten von Rattenkollagen aus Haut, Sehne und Knochen

Für die meisten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde das Ausgangsmaterial von Ratten gewonnen, die durch Gabe von β -Aminopropionitril-Fumarat (BAPN) lathyritisch gemacht worden waren. Durch das BAPN wird das Enzym Lysinoxidase irreversibel gehemmt, das durch Bildung von Lysinaldehyd (α -Amino-Adipinsäure- ϵ -Semialdehyd) aus Lysin diesen Rest für die Quervernetzung vorbereitet (24). Durch diese Behandlung ist es möglich, aus den drei untersuchten Geweben Haut, Sehne und Knochen dieser Tiere ein Vielfaches an löslichem Kollagen im Vergleich zu unbehandelten Ratten zu gewinnen. So wurde bei der Extraktion von Neutralsalz-löslichem Kollagen (NLK) aus der Haut von lathyritischen Ratten die dreibis vierfache Menge im Vergleich zu unbehandelten Tieren isoliert.

Zur Gewinnung von NLK aus Haut, Sehnen und Knochen wurde das jeweilige Gewebe zerkleinert und mit 1 M NaCl bei neutralem pH für 48 h bei 4°C extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das NLK aus dem Überstand ausgefällt und durch Umfällen gereinigt. Die auf diese Weise gewonnenen Kollagene dienten als Ausgangsmaterial für die Trennung in $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten. Für die Immunisierungsexperimente wurde nur das NLK der Haut eingesetzt.

Im Laufe der Untersuchungen wurden Hinweise dafür erhalten, daß bei der Extraktion unter neutralen Bedingungen vermutlich durch Gewebsproteasen, die bei der Zerkleinerung des

Gewebes freigesetzt werden, kürzere Peptide von den Enden des Kollagenmoleküls abgespalten werden. Um dies möglichst zu verhindern, wurde in Paralleluntersuchungen unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidin-HCl für 2 h bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Abzentrifugieren des Gewebes wurden Harnstoff, bzw. Guanidin durch Dialyse gegen den Kettentrennungspuffer (0,06 M Natriumacetat, pH 4,8) entfernt.

Die anschließende Trennung der Ketten wurde an CM-Cellulose nach der Methode von Piez et al. (25), (26) durchgeführt. Abb. 2. zeigt das Bild einer Kettentrennung für Kollagen von lathyritischen Ratten.

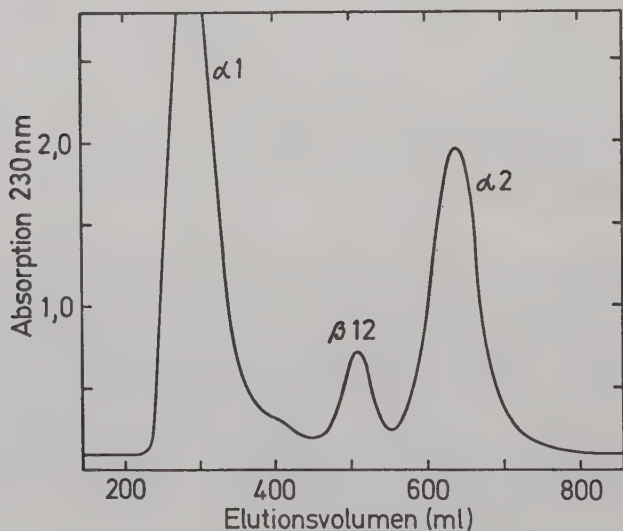


Abb. 2. Kettentrennung von löslichem Kollagen aus lathyritischen Ratten an CM-Cellulose, Natriumacetat, pH 4,8 mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,1 M NaCl über ein Gesamtvolumen von 900 ml bei 40°C.
Säule: 2,5 x 15 cm
Aufgetragene Menge: 200 mg

Für das Kollagen aus den verschiedenen Extrakten der drei Gewebe Haut, Sehne und Knochen wurde bei dieser Ketten-trennung immer das gleiche Diagramm erhalten. Die schwache Schulter am $\alpha 1$ -Peak enthielt in erster Linie $\beta 11$, ein kovalent gebundenes Dimeres der $\alpha 1$ -Kette. In Extrakten aus Geweben von nicht-lathyritischen Tieren war diese Schulter sehr viel ausgeprägter. Ebenso verhielt es sich mit dem $\beta 12$ -Peak ($\beta 12$ -kovalent gebundenes Dimeres von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette), der in diesen Extrakten größer als der $\alpha 2$ -Peak war.

Die Reinheit der α -Ketten und auch der BrCN-Peptide wurde mittels SDS-Disk-Elektrophorese überprüft. Diese Methode separiert Polypeptidketten nach ihrem Molekulargewicht. Kollagen verhält sich dabei atypisch und zeigt selbst eine Separierung zwischen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette, ebenso wie zwischen Peptiden gleicher Größe von verschiedenen Ketten (27). Das erfordert für Molekulargewichtsbestimmungen eine Kalibrierung mit Kollagenpeptiden bekannter Größe einer bestimmten α -Kette. Es erlaubt aber auch, diese Methode als Reinheitskriterium einzusetzen.

Der $\alpha 1$ -Peak zeigte in der Disk-Elektrophorese eine starke $\alpha 1$ -Bande und eine schwache $\beta 11$ -Bande in der Größenordnung von 5% des $\alpha 1$. Für den Bromcyanabbau (siehe folgendes Kapitel) wurden diese $\alpha 1$ -Ketten ohne weitere Reinigung verwendet. Für die Aminosäureanalysen und die entsprechenden Immunisierungsexperimente wurde durch Rechromatographie unter gleichen Bedingungen das $\beta 11$ abgetrennt.

Die Aminosäurezusammensetzung der $\alpha 1$ -Kette von Haut, Sehne und Knochen ist in Tabelle 1. angegeben.

Die deutlichsten Unterschiede sind im Tyrosin- und im Hydroxyllysingehalt zu finden. Die $\alpha 1$ -Ketten von Knochen- und Sehnenkollagen weisen im Vergleich mit derjenigen von

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung der Rattenkollagen- $\alpha 1$ -Ketten aus Haut (NLK), Haut (8 M Harnstoff), Sehne (6 M Guanidin) und Knochen (6 M Guanidin).

	$\alpha 1$ Haut (NLK)	$\alpha 1$ Haut (Harnst.)	$\alpha 1$ Sehne (Guan.)	$\alpha 1$ Knochen (Guan.)
3-Hydroxyprolin	1 (0,8)	1 (0,7)	2 (2,1)	1 (1,0)
4-Hydroxyprolin	95	96	98	101
Asparaginsäure	46	48	49	49
Threonin	21	22	22	22
Serin	39	43	44	43
Homoserin	-	-	-	-
Glutaminsäure	78	81	84	84
Prolin	130	132	128	127
Glycin	342	337	343	340
Alanin	116	107	111	114
Valin	22	21	22	21
Methionin	7 (6,8)	8 (7,5)	8 (7,5)	7 (7,4)
Isoleucin	6 (6,0)	7 (6,6)	7 (6,7)	7 (6,8)
Leucin	22	22	23	22
Tyrosin	2 (1,7)	3 (3,3)	5 (4,6)	4 (4,4)
Phenylalanin	13	14	15	15
Hydroxylysin	5 (5,2)	5 (4,8)	5 (5,4)	15
Histidin	2 (1,8)	2 (2,3)	2 (2,2)	2 (2,2)
Lysin	33	33	34	24
Arginin	51	53	53	55
Summe	1031	1035	1055	1053

Hautkollagen einen von 2 auf 4 bzw. 5 steigenden Tyrosinwert auf. Der Hydroxylysingehalt der $\alpha 1$ -Kette von Knochenkollagen ist dreimal größer als der der $\alpha 1$ -Ketten von Haut- und von Sehnenkollagen.

Im Kollagen sind die OH-Gruppen bestimmter Hydroxylysinreste β -glykosidisch mit Glucosyl-Galactose oder Galactose verbunden (28). In Rinderbasalmembran- und Hühnerknorpelkollagen

ist mit einer Erhöhung im Hydroxylysingehalt um das Dreifache (im Vergleich mit dem Hautkollagen) eine Zunahme der Kohlenhydratkomponenten um das Achtfache (Basalmembran) bzw. Fünffache (Hühnerknorpel) verbunden (29), (30). Bei einem Vergleich der Kohlenhydratkomponenten der $\alpha 1$ -Ketten aus Rattenhaut- und Rattenknochenkollagen findet sich dagegen nur ein geringfügiger Anstieg um ca. 40%, wie aus Tabelle 2. zu entnehmen ist.

Tabelle 2. Kohlenhydratkomponenten der Rattenkollagen- $\alpha 1$ -Ketten von Haut und Knochen.

	Glc-Gal-Hyl ^x	Gal-Hyl ^x
$\alpha 1$ -Kette (Haut)	0,7	2,1
$\alpha 1$ -Kette (Knochen)	1,3	2,7

^x Glycopeptidreste pro $\alpha 1$ -Kette

C.1.2. Isolierung und Vergleich von α 1-CB6 aus Haut- und Sehnenkollagen

Im Tyrosingehalt waren bei einem Vergleich der α 1-Ketten von Haut-NLK und von Sehnenkollagen aus dem Guanidinextrakt charakteristische Unterschiede gefunden worden. Es lag nahe, dies auf eine Teilspaltung der terminalen tyrosinhaltigen Bereiche zurückzuführen. Um diese Bereiche näher charakterisieren zu können, wurde die α 1-Kette nach Bornstein et al. (31) mit BrCN gespalten.

Das BrCN-Abbaugemisch wurde zunächst über eine Bio-Gel P-4-Säule gegeben, um die kurzen N-terminalen Peptide abzutrennen (vgl. Abb. 3.). Durch diese Fraktionierung wurde das α 1-CB1 mit 17 Aminosäuren erhalten, außerdem konnte aus dem Salzpeak das α 1-CB0 mit 2 Aminosäuren isoliert werden.

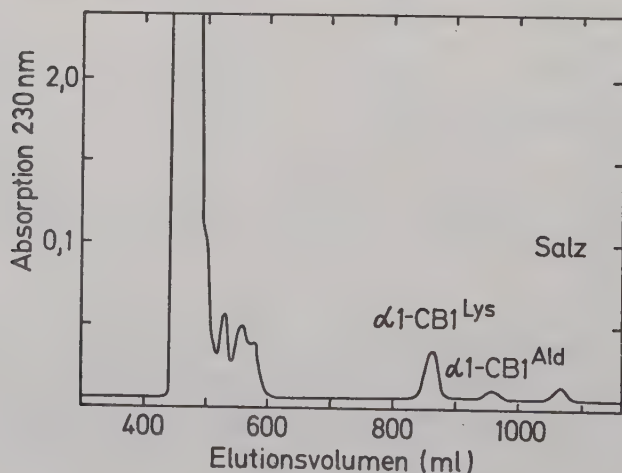


Abb. 3. Auftrennung der BrCN-Peptide der α 1-Kette von Rattenkollagen an Bio-Gel P-4 in 0,1 M Essigsäure.
Säule: 3,5 x 138 cm
Aufgetragene Menge: 100 mg

Anschließend wurde der Hauptpeak der Bio-Gel P-4-Trennung an einer Bio-Gel P-150-Säule fraktioniert. Die Auftrennung ergab das in Abb. 4. dargestellte Diagramm, das für alle Gewebe gleich war.

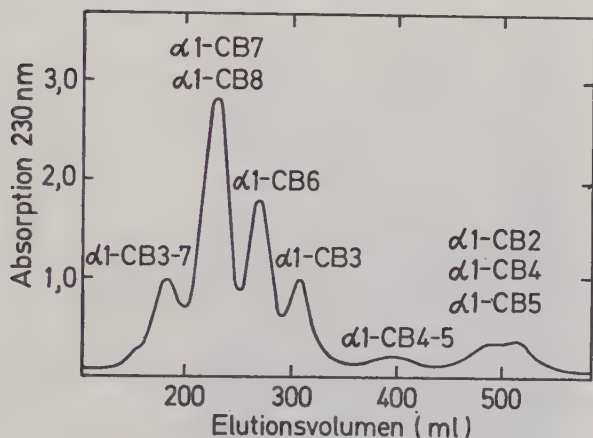


Abb. 4. Chromatographie der großen BrCN-Peptide (Hauptpeak der Abb. 3.) der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen an Bio-Gel P-150 in 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 bei 38°C.
Säule: 3,5 x 88 cm
Aufgetragene Menge: 80 mg

Der $\alpha 1$ -CB6-Peak wurde unter identischen Bedingungen rechromatographiert. Danach wurde für das $\alpha 1$ -CB6 in der SDS-Disk-Elektrophorese eine einzige Bande erhalten. Auch eine Ionenaustausch-Chromatographie an CM-Cellulose in Natriumcitratpuffer bei pH 3,6 ergab keinen Hinweis auf eine Verunreinigung von $\alpha 1$ -CB6 mit einem anderen BrCN-Peptid.

Das $\alpha 1$ -CB6 wies kein Homoserin auf und war damit als C-terminales BrCN-Peptid der $\alpha 1$ -Kette identifiziert. Zusätzlich wurde die Zuordnung mit Hilfe der Elektronenmikroskopie getroffen. Dies ist aufgrund der charakteristischen Eigenschaft des Kollagens möglich, daß man Kollagenlösungen ($\alpha 1$ -Ketten oder kleinere Peptide bis zu 60 AS) renaturieren kann. Die

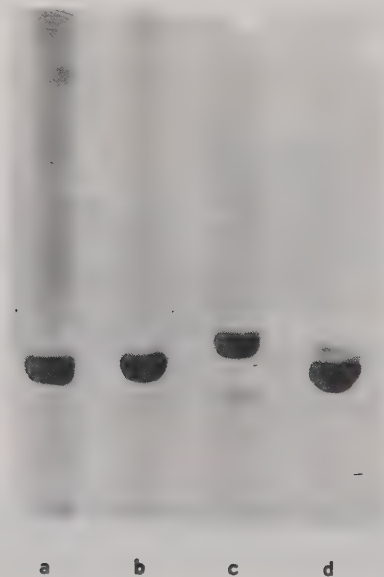


Abb. 5. SDS-Disk-Elektrophorese von $\alpha 1$ -CB6 aus

a) Haut (NLK)

b) Sehne (NLK)

c) Sehne (6 M Guanidin-Extrakt)

d) Haut (8 M Harnstoff-Extrakt)

In 10 cm langen Gelen (10 %).

Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS,

0,025 M Tris. HCl, pH 8,3

Stromstärke: 2,2 mA/Gelröhrchen; Laufzeit: 2 1/2 h

dabei erhaltenen trippelhelicalen Molekülbruchstücke wurden mit ATP zu sogenannten Long-Spacing-Segmenten ausgefällt. Nach Anfärben mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat konnte das $\alpha 1$ -CB6 anhand des Querstreifungsmusters unter dem Elektronen-

mikroskop als C-terminales BrCN-Peptid zugeordnet werden. Mit dieser Methode konnten Rauterberg und Kühn (32) die Reihenfolge der BrCN-Peptide der α 1-Kette von Kalbshautkollagen aufklären.

Abb. 5. zeigt die Charakterisierung in der SDS-Disk-Elektrophorese von α 1-CB6 aus Haut- und Sehnenkollagen nach unterschiedlichen Extraktionsmethoden.

Es fällt auf, daß die α 1-CB6-Peptide von Haut-NLK und Sehnen-NLK eine schnellere Wanderungsgeschwindigkeit als

Tabelle 3. Aminosäurezusammensetzung von α 1-CB6 aus Rattenhaut und Schwanzsehne nach unterschiedlichen Extraktionsmethoden.

	Haut		Sehne	
	NLK α 1-CB6	Harnst. α 1-CB6	NLK α 1-CB6	Guan. α 1-CB6
3-Hydroxyprolin	1 (1,0)	1 (0,9)	2 (1,7)	2 (2,0)
4-Hydroxyprolin	15	15	16	16
Asparaginsäure	10	10	10	11
Threonin	4 (4,0)	4 (4,1)	4 (4,2)	4 (4,2)
Serin	10	11	10	13
Homoserin	-	-	-	-
Glutaminsäure	13	14	13	17
Prolin	31	30	30	32
Glycin	66	65	65	68
Alanin	19	19	20	20
Valin	2 (1,6)	2 (1,6)	2 (1,7)	1 (1,4)
Methionin	-	-	-	-
Isoleucin	3 (2,9)	3 (2,9)	3 (3,1)	3 (2,7)
Leucin	4 (3,9)	4 (4,4)	4 (4,2)	5 (5,0)
Tyrosin	1 (0,8)	1 (1,2)	1 (1,0)	2 (2,4)
Phenylalanin	1 (1,2)	2 (2,2)	2 (1,7)	3 (3,1)
Hydroxylysin	2 (1,7)	2 (1,8)	2 (2,0)	2 (1,6)
Histidin	1 (0,9)	1 (1,0)	1 (1,4)	1 (1,0)
Lysin	3 (3,3)	4 (3,6)	3 (2,7)	4 (4,2)
Arginin	11	11	11	12
Summe	197	199	199	216

das $\alpha 1$ -CB6 aus dem Guanidinextrakt der Sehne aufweisen. Dies deutet auf ein höheres Molekulargewicht für das guanidin-extrahierte Sehnen- $\alpha 1$ -CB6 hin.

Das $\alpha 1$ -CB6 aus dem Harnstoffextrakt der Haut zeigt zwei Banden, die den oben beschriebenen entsprechen, von denen aber die schneller wandernde Bande deutlich überwiegt.

Auch in der Aminosäurezusammensetzung weisen die verschiedenen $\alpha 1$ -CB6 signifikante Unterschiede auf (siehe Tabelle 3.).

Die deutlichsten Unterschiede zwischen dem $\alpha 1$ -CB6 aus dem Guanidinextrakt der Sehne und den anderen Peptiden sind im Gehalt an Tyrosin, Phenylalanin, sowie an Glutaminsäure zu finden. Außerdem fällt auf, daß das $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen ein zusätzliches 3-Hydroxyprolin aufweist.

C.1.3. Nachweis des nichthelicalen Bereiches am $\alpha 1$ -CB6

Aus den vorangegangenen Untersuchungen war entsprechend den Erfahrungen am Kalbshautkollagen (33) zu erwarten, daß im $\alpha 1$ -CB6 aus dem Kollagen von guanidinextrahierten Sehnen ein nichthelicaler Bereich nachzuweisen war. Deshalb wurde dieses Peptid analog dem $\alpha 1$ -CB6 von Kalbshautkollagen mit Chymotrypsin gespalten. Dabei wurden die drei Peptide C1, C2 und C3 in einem molaren Verhältnis von 1,0 : 0,9 : 0,6 erhalten. Diese Werte wurden durch quantitative Aminosäureanalyse nach Trennung der Peptide an Bio-Gel P-10 (siehe Abb. 6.) ermittelt.

Durch Eichung der Säule mit Peptiden bekannter Größe konnten folgende Aminosäurezahlen für die chymotryptischen Peptide bestimmt werden:

C1	=	120 AS
C2	=	85 AS
C3	=	15 AS.

Diese Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Aminosäurezahlen der entsprechenden Peptide aus dem $\alpha 1$ -CB6 von Kalbshautkollagen (33).

Das C3 war nach der Bio-Gel P-10-Trennung ausreichend rein. Die Peptide C1 und C2 wurden durch Rechromatographie an Phosphocellulose (0,001 M Natriumacetat, pH 3,6) mit einem konkaven Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl über ein Gesamtvolumen von 200 ml vollständig gereinigt,

Aus Tabelle 4. ist ersichtlich, daß das C3 aufgrund des geringen Glycingehaltes eindeutig nichthelical ist. Weiterhin zeigt die Tabelle, daß die Peptide C1, C2, C3 alle Amino-

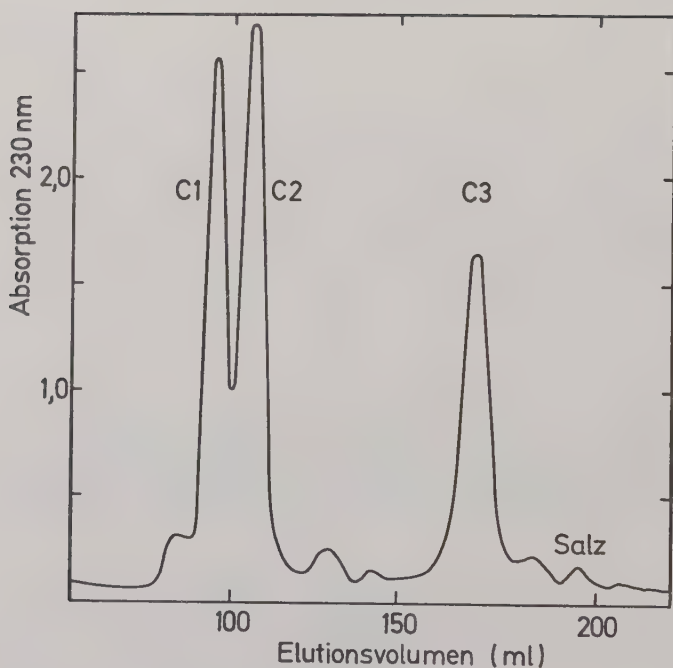


Abb. 6. Fraktionierung der Chymotrypsinpeptide (C1,C2,C3) von $\alpha 1$ -CB6 (Sehne, Guanidinextrakt) an Bio-Gel P-10 in 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 bei 38°C.
Säule: 1,5 x 120 cm
Aufgetragene Menge: 10 mg

säuren des $\alpha 1$ -CB6 umfassen.

Wegen der großen Ähnlichkeit in Größe und Aminosäurezusammensetzung mit den chymotryptischen Fragmenten von $\alpha 1$ -CB6 aus Kalbshautkollagen (33) ist auch für das $\alpha 1$ -CB6 von Rattenkollagen die Reihenfolge C1-C2-C3 angezeigt.

Tabelle 4. Aminosäurezusammensetzung der Chymotrypsinpeptide C1, C2, C3 von $\alpha 1$ -CB6 (Rattenschwanzsehne, Guanidin-extrakt).

	Rattensehne (Guanidinextrakt)				$\alpha 1$ -CB6
	C1	C2	C3	C1-3	
3-Hydroxyprolin	-	2 (1,9)	-	2	2 (2,0)
4-Hydroxyprolin	7 (7,1)	9 (8,7)	-	16	16
Asparaginsäure	6 (6,3)	3 (3,3)	2 (2,0)	11	11
Threonin	3 (3,0)	1 (1,2)	-	4	4 (4,2)
Serin	3 (3,3)	8 (7,7)	2 (1,9)	13	13
Homoserin	-	-	-	-	-
Glutaminsäure	9 (9,5)	4 (4,0)	5 (5,1)	18	17
Prolin	15	14	3 (3,1)	32	32
Glycin	38	28	2 (2,1)	68	68
Alanin	14	5 (5,0)	-	19	20
Valin	1 (1,2)	-	-	1	1 (1,4)
Methionin	-	-	-	-	-
Isoleucin	2 (1,9)	1 (1,0)	-	3	3 (2,7)
Leucin	1 (1,1)	3 (3,1)	1 (1,2)	5	5 (5,0)
Tyrosin	-	1 (0,9)	2 (1,8)	3	2 (2,4)
Phenylalanin	1 (0,8)	-	2 (1,9)	3	3 (3,1)
Hydroxylysin	2 (1,7)	-	-	2	2 (1,6)
Histidin	1 (1,0)	-	-	1	1 (1,0)
Lysin	2 (2,4)	1 (1,0)	1 (0,9)	4	4 (4,2)
Arginin	8 (7,8)	3 (3,2)	1 (1,0)	12	12
Summe	113	83	21	217	216

Für das C1 und das C2 sowohl von Rattensehnen- als auch von Rattenhautkollagen ergeben sich im Vergleich mit den entsprechenden Peptiden aus dem Kollagen der Kalbshaut nur geringfügige Austausche, insgesamt drei auf 196 Aminosäuren (vgl. Abschnitt C.I.4.).

Bei dem wesentlich kürzeren C3 (21 Aminosäuren) sind ebenfalls drei Austausche gegenüber dem entsprechenden Peptid aus Kalbshautkollagen festgestellt worden.

Ein Leucin-, ein Alanin- und ein Histidinrest in der Kalbssequenz sind im Ratten- $\alpha 1$ -CB6-C3 durch einen Phenylalanin-,

einen Serin- und einen Glutaminsäure (oder Glutamin)-Rest ersetzt. Da die Sequenz von Kalbs- $\alpha 1$ -CB6-C3 bekannt ist (10), soll der Vergleich anhand dieser Sequenz vorgenommen werden (Abb. 7.).

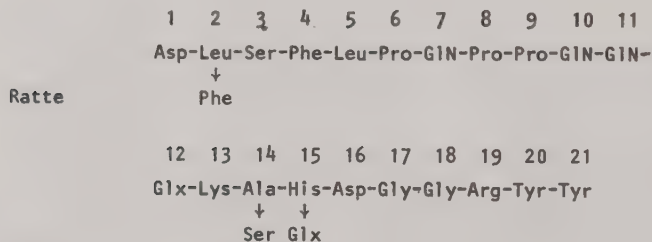


Abb. 7. Aminosäuresequenz von $\alpha 1$ -CB6-C3 aus Kalbshautkollagen nach (10) und vermutliche AS-Austausche im Ratten- $\alpha 1$ -CB6-C3.

In Abb. 7. sind ein Leu-Phe-, ein Ala-Ser- und ein His-Glx-Austausch angegeben. Die Evidenzen für diese Austausche sind:

- 1) Nach Trypsinspaltung von $\alpha 1$ -CB6-C3, die nur sehr unvollständig verlief, konnte das Hexapeptid C3 (14-19) nach Bio-Gel P-2-Trennung erhalten werden. Trotz Verunreinigung mit anderen Spaltprodukten konnte die Zusammensetzung Ser, Glx, Asx, Gly, Gly, Arg wahrscheinlich gemacht werden, so daß zwei der drei Austausche in dem C-terminalen Peptid C3 (14-19) liegen sollten. Vermutlich ist die unvollständige Spaltung von Trypsin auf den zusätzlichen Glutaminsäure- bzw. Glutaminrest zurückzuführen.
- 2) Damit bliebe noch ein Leu-Phe-Austausch beim Vergleich der $\alpha 1$ -CB6-C3 von Kalbshaut- und Rattenkollagen. Dafür

kommen zwei Möglichkeiten in Frage: der Leucinrest in 2- oder der in 5-Stellung. Nach den Aminosäureanalysen der kürzeren α 1-CB6-Peptide von Sehnen-NLK und von Hautkollagen nach Harnstoffextraktion (vgl. Tabelle 3.) sollte der erste Leucinrest ausgetauscht sein, da mit dem erhöhten Phenylalaninwert keine entsprechende Zunahme an Leucin zu verzeichnen ist.

- 3) Es wurden keine Hinweise auf weitere Austausche erhalten. Insbesondere konnte nach Trypsinspaltung die Tyr-Tyr-Endsequenz eindeutig durch Dünnschichtchromatographie (Referenz: synthetisches Tyrosyltyrosin) und durch Aminosäureanalyse (vor und nach Hydrolyse) bewiesen werden.

Bei der Untersuchung des α 1-CB6 von Rattenhautkollagen nach Harnstoffextraktion konnte das C3 in gleicher Zusammensetzung wie das Sehnen-C3 isoliert werden. Allerdings war die Ausbeute mit maximal 0,1 Mol C3 pro Mol C1 oder C2 sehr gering. Ein analoges C3 konnte auch im Guanidinextrakt aus Rattenknochen (siehe Abschnitt C.1.6.), jedoch nicht im NLK von Rattenhaut (siehe folgenden Abschnitt) nachgewiesen werden.

C.1.4. C-terminale Struktur des $\alpha 1$ -CB6 aus NLK von Rattenhaut

Die Untersuchungen an diesem Peptid sollten zeigen, welches Ausmaß die Verkürzung der nichthelicalen Sequenz bei der Neutralsalzextraktion erreicht (vgl. Abb. 5.). Eine genauere Strukturkenntnis des NLK- $\alpha 1$ -CB6 war zusätzlich notwendig, weil die Antikörper gegen die antigene Determinante auf dem $\alpha 1$ -CB6 durch Immunisierung mit NLK aus Rattenhaut erzeugt worden war.

Das chymotryptische Gemisch von $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK wurde zuerst an Bio-Gel P-4 getrennt (Abb. 8.), um mögliche Degradationsprodukte des C3 besser erfassen zu können. Die Peptide C1 und C2 erschienen zusammen im Ausschlußpeak der Säule. Ein weiteres Peptid konnte lediglich im Salzpeak

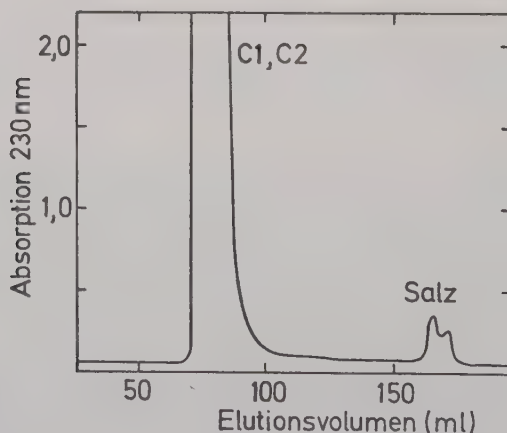


Abb. 8. Auftrennung der Chymotrypsinpeptide von $\alpha 1$ -CB6 (Haut, NLK) an Bio-Gel P-4 in 0,1 M Essigsäure.
Säule: 1,6 x 106 cm
Aufgetragene Menge: 20 mg

nachgewiesen werden. Es handelte sich in Analogie zum $\alpha 1$ -CB6 aus Kalbshautkollagen um das Nebenspaltprodukt Arg-Gly-Phe aus dem C1 (33).

Durch Chromatographie der Hauptfraktion (C1, C2) an Bio-Gel P-150 in 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5, konnten C1 und C2 voneinander separiert und in ausreichender Reinheit erhalten werden.

Tabelle 5. Aminosäurezusammensetzung der Chymotrypsinpeptide $\alpha 1$ -CB6-C1 aus Ratten- und Kalbshautkollagen.

	C1 Ratte	C1 ⁺ Kalb	
3-Hydroxyprolin	-	-	
4-Hydroxyprolin	7 (6,7)	7	
Asparaginsäure	6 (6,2)	5	✖
Threonin	3 (2,9)	3	
Serin	3 (3,1)	4	✖
Homoserin	-	-	
Glutaminsäure	9 (9,5)	9	
Prolin	16	15	✖
Glycin	38	38	
Alanin	13	13	
Valin	1 (1,1)	2	✖
Methionin	-	-	
Isoleucin	2 (2,0)	2	
Leucin	1 (1,1)	1	
Tyrosin	-	-	
Phenylalanin	1 (0,6)	1	
Hydroxylysin	2 (1,8)	2	
Histidin	1 (0,9)	1	
Lysin	2 (2,0)	2	
Arginin	8 (7,7)	8	
Summe	113	113	

⁺ Sequenzdaten nach (10)

Tabelle 5. zeigt die Aminosäurezusammensetzung von $\alpha 1$ -CB6-C1

aus Rattenhaut, die praktisch identisch mit derjenigen von Sehnen-C1 ist (vgl. Tabelle 4.). Zum Vergleich ist die Zusammensetzung des entsprechenden Peptides von Kalbshautkollagen angegeben. Die Unterschiede zwischen beiden Peptiden sind in der Tabelle durch * gekennzeichnet. Danach ergeben sich zwei Substitutionen in der Sequenz des $\alpha 1$ -CB6-C1 von Kalbshautkollagen. Weitere Austausche sind möglich, jedoch nicht wahrscheinlich. Eine Klärung dieser Frage wurde nicht angestrebt, da das C1 serologisch inaktiv war (siehe Abschnitt C.11.2.) und nicht weiter untersucht wurde.

Die Aminosäurezusammensetzung des $\alpha 1$ -CB6-C2 aus Haut-NLK unterscheidet sich nicht signifikant von dem C2 des Sehnenkollagen (vgl. Tabelle 6. und 4.). Um etwaige kleinere Unterschiede am C-Terminus nicht zu übersehen, wurde das C2 von Haut-NLK mit Trypsin abgebaut. Die tryptischen Peptide wurden zuerst an Sephadex G-50 getrennt (Abb. 9.).

Die Bezeichnung der Peptide erfolgte in Analogie zu den entsprechenden Peptiden von Kalbshautkollagen (11).

Das Dipeptid C2-T4 war bereits nach dieser Trennung ausreichend rein. Die restlichen tryptischen Peptide wurden nach Chromatographie an Phosphocellulose in reiner Form erhalten. Abb. 10. zeigt als Beispiel die Trennung von T1 und T5 an Phosphocellulose. Neben C2-T1 und C2-T5 wurde zusätzlich ein Peptid erhalten, das nach Aminosäureanalyse Lysin und Arginin enthielt und eindeutig als Doppelpeptid T2-T3 identifiziert werden konnte.

Die nach der Sephadex G-50-Trennung anhand einer Eichkurve mit Peptiden bekannter Größe ermittelten Längen für die Peptide C2-T1, C2-T2, C2-T3 und C2-T5 stimmten sehr gut mit den aus der Aminosäureanalyse berechneten Werten überein. In Tabelle 5. ist die Aminosäurezusammensetzung der trypti-

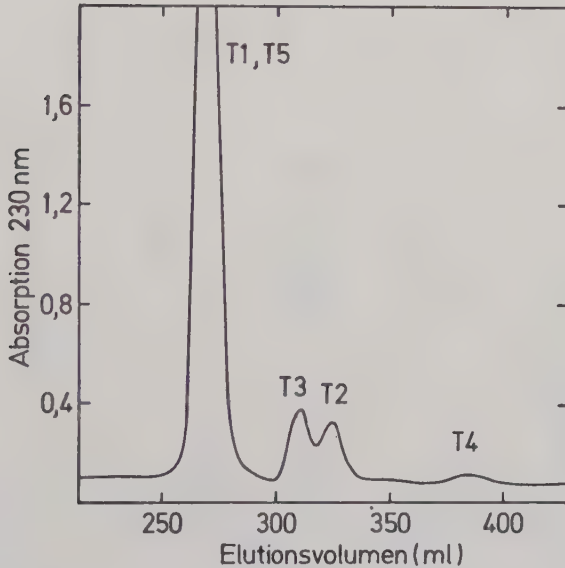


Abb. 9. Fraktionierung der Trypsinpeptide (C2-T1 bis C2-T5) von $\alpha 1$ -CB6-C2 aus Rattenhaut-NLK an Sephadex G-50 in 0,03 M Natriumacetat, pH 4,5 bei 38°C.
Säule: 2,0 x 140 cm
Aufgetragene Menge: 10 mg

schen Peptide von Haut-NLK- $\alpha 1$ -CB6-C2 angegeben.

Das C2-T5 enthält weder Lysin noch Arginin und ist damit eindeutig das C-terminale Peptid. Ein Vergleich mit den entsprechenden Kalbspeptiden zeigt, daß die Rattenpeptide C2-T1 bis C2-T4 in der AS-Zusammensetzung mit den Kalbspeptiden identisch sind, wenn man von der Hydroxylierung eines Prolinrestes im C2-T2 des Ratten- $\alpha 1$ -CB6 absieht. Das selten vorkommende 3-Hydroxy-Prolin, das einzige in der

Tabelle 6. Aminosäurezusammensetzung der Trypsinpeptide von $\alpha 1$ -CB6-C2 (C2-T1 bis C2-T5) aus Rattenhaut-NLK.

	C2-T1	C2-T2	C2-T3	C2-T4	C2-T5	T1-T5	C2
3-Hydroxyprolin	-	-	1 (0,9)	-	-	1	1 (1,1)
4-Hydroxyprolin	3 (2,5)	1 (1,3)	2 (1,7)	-	4 (3,6)	10	9 (9,0)
Asparaginsäure	-	-	2 (1,8)	-	2 (2,0)	4	4 (4,0)
Threonin	-	-	-	-	1 (1,0)	1	1 (1,2)
Serin	4 (3,8)	2 (1,8)	-	-	2 (1,9)	8	8 (7,6)
Homoserin	-	-	-	-	-	-	-
Glutaminsäure	3 (3,3)	-	-	-	-	3	4 (3,8)
Prolin	5 (4,9)	2 (1,8)	2 (2,4)	-	7 (6,8)	16	15
Glycin	9 (9,4)	4 (4,4)	5 (5,4)	1 (1,1)	9 (9,2)	28	28
Alanin	2 (2,4)	1 (1,1)	-	-	1 (1,0)	4	5 (5,3)
Valin	-	-	-	-	-	-	-
Methionin	-	-	-	-	-	-	-
Isoleucin	-	-	1 (0,9)	-	-	1	1 (1,0)
Leucin	1 (1,0)	-	2 (2,0)	-	-	3	3 (2,9)
Tyrosin	-	-	-	-	1 (0,9)	1	1 (0,8)
Phenylalanin	-	-	-	-	-	-	-
Hydroxylysin	-	-	-	-	-	-	-
Histidin	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	-	1 (0,8)	-	-	-	1	1 (1,1)
Arginin	1 (1,0)	-	1 (1,0)	1 (1,0)	-	3	3 (3,3)
Summe	28	11	16	2	27	84	84

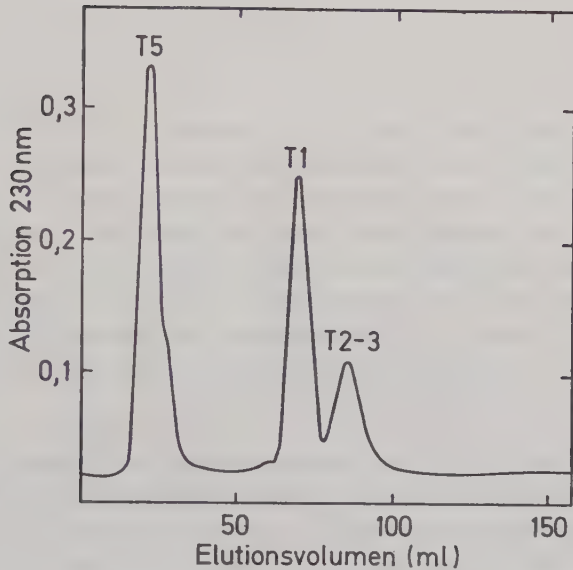


Abb. 10. Chromatographie des ersten Peaks der Abb. 9. (C2-T1, C2-T5) an Phosphocellulose in 0,001 M Natriumacetat pH 3,6 bei 38°C mit einem konkaven Gradienten von 0 - 0,3 M NaCl über ein Gesamtvolumen von 200 ml. Säule: 1,0 x 7 cm Aufgetragene Menge: 6 mg

α 1-Kette von Rattenhautkollagen, wird wie im Kalbshautkollagen im α 1-CB6-C2-T3 gefunden. Der zweite 3-Hydroxyprolinrest im α 1-CB6 von Rattensehnenkollagen (siehe Tabelle 2.) konnte in analogen Abbaubersuchen im C2-T5 lokalisiert werden.

Im Gegensatz zu den anderen tryptischen Peptiden des

$\alpha 1$ -CB6-C2 wies das serologisch aktive C-terminale Peptid C2-T5 von Haut-NLK zwei Unterschiede zum entsprechenden Kalbspeptid auf. Erstens sollte ein Alaninrest in der Kalbssequenz gegen ein Serin im C2-T5 des Ratten- $\alpha 1$ -CB6 ersetzt sein. Das C2-T5 von Kalbshautkollagen weist noch einen Teil des nichthelicalen Bereiches mit der Sequenz Ser-Gly-Gly-Tyr auf. Somit sollte der Austausch im helicalen Bereich des C2-T5 lokalisiert sein. Zweitens wurde im C2-T5 von Rattenhautkollagen mit 2 Asp ein zusätzlicher Asparaginsäure- bzw. Asparaginrest gegenüber dem Peptid aus Kalbshautkollagen gefunden. Da auch das aus dem C2 von Sehnenkollagen isolierte tryptische Peptid C2-T5 nur einen Asparaginsäurerest aufwies, wurde vermutet, daß der zweite Rest sich zusätzlich am C-Terminus befindet. Eine Analyse der C-terminalen Aminosäure sollte dies zeigen.

In der Tabelle 7. ist das Ergebnis der Hydrazinolyse von $\alpha 1$ -CB6 und $\alpha 1$ -CB6-C2 aus Haut-NLK in Abhängigkeit von der Zeit angegeben.

Tabelle 7. Menge an freien Aminosäuren nach Hydrazinolyse von $\alpha 1$ -CB6 und $\alpha 1$ -CB6-C2 aus Haut-NLK.
Hydrazinolysetemperatur: 80°C für 6 h, 20 h und 40 h.
Angabe in $\mu\text{Mol}/\mu\text{Mol}$ Peptid.

		6 h	20 h	40 h	40 h *
$\alpha 1$ -CB6	Asp	0,29	0,23	0,34	(0,85)
	Tyr	0,07	0,11	0,28	(0,31)
	Gly	0,15	0,54	0,55	(0,71)
	Ser	0,02	0,12	0,11	(0,14)
$\alpha 1$ -CB6-C2	Asp		0,29	0,29	(0,73)
	Tyr		0,11	0,26	(0,29)
	Gly		0,34	0,40	(0,51)
	Ser		0,11	0,13	(0,16)

* Korrigierte Werte nach (34)

Die einzelnen Aminosäuren zeigen unter Hydrazinolysebedingungen eine sehr unterschiedliche Stabilität. Deshalb sind in Tabelle 7. die korrigierten 40 h-Werte nach Braun und Schroeder (34) angegeben. Danach zeigen Asparaginsäure und Tyrosin ein Verhältnis von 3:1 in annähernd stöchiometrischer Ausbeute.

Zusätzlich wurde ein hoher Ausbeutewert für Glycin und ein mittlerer für Serin erhalten. Nach Verkürzung der Hydrazinolysezeit auf 6 h erniedrigten sich die Werte für diese Aminosäuren sehr deutlich. Dies ist in Übereinstimmung mit den für Glycin und Serin beschriebenen hohen Rückspaltungsraten bei der Hydrazinolyse (34), (35). Folglich sind Glycin und Serin als Endgruppen unwahrscheinlich.

Die Interpretation des Ergebnisses der Hydrazinolyse wird dadurch unterstützt, daß aus dem vollständig langen $\alpha 1$ -CB6 sowohl von Rattensehnenkollagen als auch von Rattenhautkollagen ein C2-T5 mit nur einem Asparaginsäurerest isoliert werden konnte. Für das $\alpha 1$ -CB6 und das $\alpha 1$ -CB6-C2 von Haut-NLK konnte das gleiche Ergebnis erhalten werden. Aufgrund der Aminosäureanalyse und weil Trypsin die Tyr-Asp-Bindung nicht spalten kann, ist anzunehmen, daß auch das C2-T5 größtenteils Asparaginsäure als C-terminale Aminosäure aufweist.

C.1.5. Das N-terminale Ende der $\alpha 1$ -Kette von Rattenhautkollagen

Die bisherigen Erfahrungen zeigen:

- 1) Der Abbau der nichthelicalen C-terminalen Sequenz ist abhängig von den Extraktionsbedingungen.
- 2) Der Abbau ist bei der Extraktion von Rattenhaut stärker als bei der Kollagenextraktion von Sehnen.

Davon ausgehend wurde ein Ergebnis erneut untersucht, das für den N-Terminus der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen erhalten worden war. Nach BrCN-Spaltung der $\alpha 1$ -Kette von Rattensehnenkollagen hatte Bornstein (37) zwei N-terminale BrCN-Peptide $\alpha 1$ -CB0 und $\alpha 1$ -CB1 mit 2 bzw. 17 Aminosäureresten erhalten. Dies wird anhand der Sequenz in Abb. 11. veranschaulicht. Dagegen hatten Kang et al. (36) für das Rattenhautkollagen nur ein $\alpha 1$ -CB1 mit 15 Aminosäureresten beschrieben. Dieses Ergebnis konnte in eigenen Untersuchungen bestätigt werden.

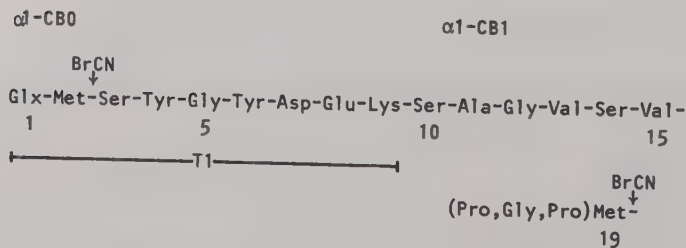


Abb. 11. Aminosäuresequenz des N-Terminus der $\alpha 1$ -Kette von Rattensehnenkollagen nach Bornstein (37).

In beiden Fällen war von NLK ausgegangen worden. Da die Mög-

lichkeit eines Extraktionsartefakts bestand, wurde das N-terminale Ende der α 1-Kette von Rattenhautkollagen nach Extraktion unter denaturierenden Bedingungen abermals untersucht.

Aus dem Harnstoffextrakt der Rattenhaut wurde das α 1-CB1 nach Trennung der BrCN-Peptide an Bio-Gel P-4 (vgl. Abb.3.) isoliert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Phosphocellulose-Chromatographie in 0,001 M Natriumacetat, pH 3,6 (Gradient 0 - 0,2 M NaCl). Das α 1-CB1 wies die in Tabelle 8. angegebene Aminosäurezusammensetzung auf und war mit dem

Tabelle 8. Aminosäurezusammensetzung von α 1-CB1, α 1-CB0 und T1 aus Rattenhautkollagen (Harnstoffextrakt).

	Rattenhaut (Harnstoffextrakt)		
	α 1-CB1	α 1-CB0	T1
3-Hydroxyprolin	-	-	-
4-Hydroxyprolin	-	-	-
Asparaginsäure	1 (1,0)	-	1 (1,1)
Threonin	-	-	-
Serin	3 (2,6)	-	1 (1,0)
Homoserin	1 (1,2)	1 (1,0)	-
Glutaminsäure	1 (1,1)	1 (1,0)	2 (2,1)
Prolin	2 (2,0)	-	-
Glycin	3 (3,2)	-	1 (1,4)
Alanin	1 (1,1)	-	-
Valin	2 (1,9)	-	-
Methionin	-	-	1 (0,9)
Isoleucin	-	-	-
Leucin	-	-	-
Tyrosin	2 (1,7)	-	2 (1,8)
Phenylalanin	-	-	-
Hydroxylysin	-	-	-
Histidin	-	-	-
Lysin	1 (0,9)	-	1 (0,9)
Arginin	-	-	-
Summe	17	2	9

$\alpha 1$ -CB1 von Sehnenkollagen identisch. Zusätzlich wurde ein $\alpha 1$ -CB1 erhalten, das kein Lysin aufwies. Hierbei ist der Lysinrest zu Lysinaldehyd oxidiert (33), (37), und dieser wird bei der sauren Hydrolyse zerstört.

Die Isolierung des $\alpha 1$ -CB0 gelang aus dem Salzpeak der Bio-Gel P-4-Trennung. Nach Passage dieses Peaks über eine Dowex 50 X-2-Säule bei pH 2 wurde das Peptid im Durchlauf erhalten.

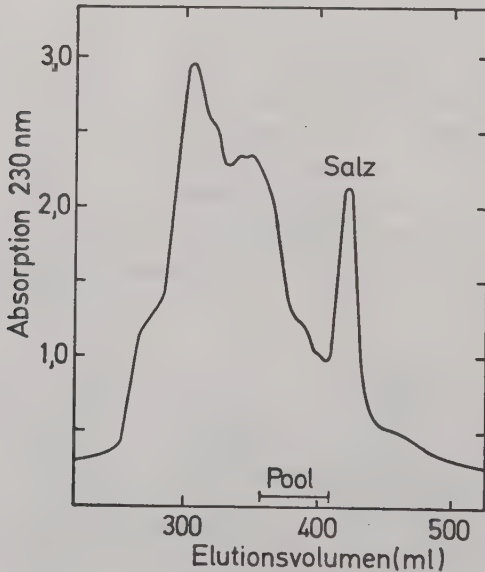


Abb. 12. Chromatographie der Trypsinpeptide der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen (Haut, Sehne) an Sephadex G-50 in 0,05 M Natriumacetat pH 4,5 bei 38°C.
Säule: 2,0 x 144 cm
Aufgetragene Menge: 90 mg

Um die Reihenfolge der kurzen CB-Peptide an dem N-Terminus der $\alpha 1$ -Kette zu klären, wurde das Überlappende tryptische

Nonapeptid T1 (vgl. Abb. 11.) isoliert. Dazu wurde die gesamte $\alpha 1$ -Kette sowohl von Rattenhautkollagen (Harnstoff-extrakt) als auch von Rattensehnenkollagen mit Trypsin gespalten und das Spaltgemisch an Sephadex G-50 getrennt (Abb. 12.).

Die in Abb. 12. gekennzeichnete Fraktion wurde direkt lyophilisiert und über eine Bio-Gel P-2-Säule gegeben. In Abb. 13 ist die erzielte Trennung wiedergegeben.

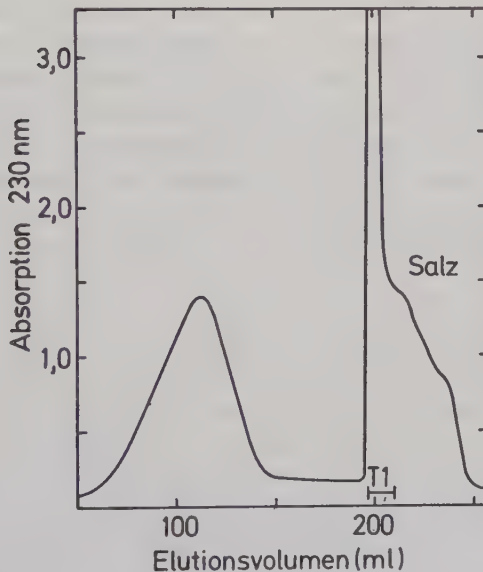


Abb. 13. Auftrennung der bezeichneten Fraktion der Abb. 12. an Bio-Gel P-2 in 0,1 M Essigsäure.
Säule: 1,5 x 115 cm
Aufgetragene Menge: Anteil von 90 mg Trypsinabbau-
gemisch der $\alpha 1$ -Kette

Bei einer weiteren Chromatographie von T1 an einer langen Bio-Gel P-4-Säule (138 cm) erschien das Peptid erst nach dem Salzpeak. Nach dieser Trennung (nicht gezeigt) hatte das T1 von Sehnen- und Hautkollagen die in Tabelle 6. angegebene Aminosäurezusammensetzung. Die einfache Reinigung von T1 beruht auf der Verzögerung von tyrosinhaltigen Peptiden an Molekularsiebsäulen (vgl. C3 an Bio-Gel P-10 in Abb. 6.), wie auch schon von Rauterberg et al. (17) beschrieben.

Das Peptid enthält Methionin und wurde mit BrCN gespalten. Der Durchlauf der Dowex 50 X-2-Säule bei pH 2 enthielt das Peptid $\alpha 1$ -CB0. Elution der Säule mit verdünntem Ammoniak ergab das Heptapeptid, das dem bereits bekannten N-terminalen tryptischen Peptid des $\alpha 1$ -CB1 von Rattensehnenkollagen entsprach (37). Dadurch ist die schon früher vorgeschlagene Reihenfolge CB0 - CB1 eindeutig bewiesen worden.

C.1.6. Die nichthelicalen Bereiche der $\alpha 1$ -Kette von Rattenknochenkollagen

Für die $\alpha 1$ -Kette von Rattenknochenkollagen war im Vergleich zu Haut- und Schwanzsehnenkollagen ein eindeutig erhöhter Hydroxylysingehalt (15 gegen 5 Resten) gefunden worden (vgl. Tabelle 1.). In Zusammenhang mit den Strukturuntersuchungen dieser Arbeit war es interessant zu untersuchen, ob Hydroxylysin in den an der Quervernetzung beteiligten nichthelicalen Bereichen am N- und C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette vorkommt.

Aus dem Guanidinextrakt von EDTA-vorbehandelten Rattenknochen wurden $\alpha 1$ -CB1 und $\alpha 1$ -CB6 nach den bisher beschriebenen Methoden isoliert. Nach Phosphocellulose-Chromatographie des $\alpha 1$ -CB1 wurde nur ein Peak erhalten, der die in Tabelle 9. angegebene Aminosäurezusammensetzung hatte. Sie entspricht derjenigen von $\alpha 1$ -CB1 aus Rattenhautkollagen (vgl. Tabelle 6.), jedoch wurde Hydroxylysin anstelle von Lysin gefunden.

Ebenfalls in Tabelle 9. ist die Aminosäurezusammensetzung von $\alpha 1$ -CB6 aus Rattenknochenkollagen angegeben. Sie zeigt eine gute Übereinstimmung mit derjenigen von $\alpha 1$ -CB6 von Rattensehnenkollagen (vgl. Tabelle 4.). Im Unterschied dazu weist das Knochenkollagenpeptid nur einen 3-Hydroxyprolinrest (wie im Hautkollagen) und einen zusätzlichen Hydroxylysinrest auf. Da gleichzeitig eine Abnahme von einem Lysinrest zu verzeichnen ist, muß ein weiterer Lysinrest im $\alpha 1$ -CB6 hydroxyliert vorliegen. Diese Annahme konnte durch Isolierung von $\alpha 1$ -CB6-C3 nach bekannten Methoden und Aminosäureanalyse bestätigt werden. Der im C3 von Sehnenkollagen gefundene Lysinrest (vgl. Tabelle 4.) ist im C3 von Knochenkollagen durch Hydroxylysin ersetzt (siehe Tabelle 9.).

Tabelle 9. Aminosäurezusammensetzung von α 1-CB1, α 1-CB6 und α 1-CB6-C3 von Rattenknochenkollagen (Guanidinextrakt).

	Rattenknochen (Guanidinextrakt)		
	α 1-CB1	α 1-CB6	α 1-CB6-C3
3-Hydroxyprolin	-	1 (0,8)	-
4-Hydroxyprolin	-	18	-
Asparaginsäure	1 (1,0)	11	2 (1,9)
Threonin	-	4 (4,1)	-
Serin	3 (2,6)	12	2 (1,7)
Homoserin	1 (1,1)	-	-
Glutaminsäure	1 (1,1)	16	4 (4,1)
Prolin	2 (1,9)	30	3 (3,2)
Glycin	3 (3,1)	69	2 (2,4)
Alanin	1 (1,1)	21	-
Valin	2 (2,0)	2 (1,9)	-
Methionin	-	-	-
Isoleucin	-	3 (2,6)	-
Leucin	-	4 (4,4)	1 (1,0)
Tyrosin	2 (1,7)	2 (1,7)	2 (1,6)
Phenylalanin	-	3 (2,9)	2 (1,9)
Hydroxylysin	1 (0,9)	3 (2,6)	1 (0,8)
Histidin	-	1 (0,8)	-
Lysin	-	4 (3,7)	-
Arginin	-	12	1 (0,8)
Summe	17	216	20

In weiteren Untersuchungen an den BrCN-Peptiden aus den mittleren Bereichen der α 1-Kette von Knochenkollagen konnte gezeigt werden, daß die restlichen acht Hydroxylysinreste auf diese Peptide verteilt sind. Daneben wurden keine Unterschiede zu den entsprechenden BrCN-Peptiden von Rattenhautkollagen (8) gefunden.

C.1.7. Diskussion

Die C-terminale nichthelicale Sequenz der $\alpha 1$ -Kette umfaßt nur etwa 10 % des entsprechenden BrCN-Peptides $\alpha 1$ -CB6. Folglich ist eine weitere Fragmentierung zur Charakterisierung des nichthelicalen Bereiches notwendig. Im Fall von Kalbshautkollagen werden nach Chymotrypsinspaltung von $\alpha 1$ -CB6 die Peptide C1, C2 und C3 erhalten (33). Das C3 ist mit 2 Glycin- von 21 Aminosäureresten eindeutig nichthelical. Das Peptid C2 weist nur noch einen nichthelicalen Anteil von 4 Aminosäuren am C-terminalen Ende auf (11).

Ein ganz analoges Ergebnis konnte für das Rattenkollagen erhalten werden. Allerdings ergaben sich hierbei in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen unterschiedliche Resultate. Die vollständige C-terminale nichthelicale Sequenz der $\alpha 1$ -Kette konnte durch denaturierende Extraktionsbedingungen nur im Fall der Schwanzsehne in hoher Ausbeute erhalten werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Erfahrungen bei der Kollagenextraktion aus Kalbshaut (10), (19) und Kaninchenhaut (38). Dagegen wurde im Fall der denaturierenden Extraktion von Rattenhautkollagen der gesamte nichthelicale Bereich der $\alpha 1$ -Kette nur in einer Ausbeute von 10 % erhalten.

Es wird angenommen, daß die Verkürzung des Kollagenmoleküls durch Gewebsproteasen bedingt ist. Ihre Aktivität kann in der Rattenhaut offensichtlich am schwierigsten gehemmt werden. Im Vergleich zur Kalbshaut weist die Rattenhaut wesentlich mehr Zellen auf. Daraus werden vermutlich bei der Zerkleinerung des Gewebes die Proteasen freigesetzt.

Für das Kalbshautkollagen ist gezeigt worden, daß der Lysinrest in der nichthelicalen Sequenz des $\alpha 1$ -CB6 zum größten

Teil zu Lysinaldehyd oxidiert ist (33). Für diese Oxidation konnte im Rattenhaut- und Rattensehnenkollagen kein Hinweis erhalten werden. Dies ist offenbar auf die Hemmung der Lysinoxidase durch BAPN, das die Tiere erhalten hatten, zurückzuführen.

Die Speziesvariabilität im Vergleich von $\alpha 1$ -CB6 aus Kalbs- und Rattenkollagen zeigt in bezug auf die Verteilung der Aminosäureaustausche eine eindeutige Richtung. In einer helicalen Sequenz von 196 Aminosäuren sind 3 Reste ausgetauscht, ebenso viel wie in dem C-terminalen Peptid C3, bestehend aus 21 Aminosäuren. Das zeigt, daß die terminale nichthelicale Sequenz der Bereich größter Variabilität zwischen den Spezies ist. Dieses Resultat stimmt mit den Sequenzuntersuchungen an den N-terminalen Enden der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von verschiedenen Spezies (4) überein.

Die von Tanzer (5) beschriebene Beteiligung von Histidin an der Quervernetzung von Kalbskollagen könnte für das $\alpha 1$ -CB6-C3 (vgl. die Sequenz in Abb. 7.) zutreffen. Allerdings muß sie für das $\alpha 1$ -CB6-C3 von Rattenkollagen eingeschränkt werden. Der fehlende Histidinrest in diesem C-terminalen nichthelicalen Peptid in Haut, Sehne und Knochen der Ratte bedeutet, daß Histidin in diesem Bereiche der Rattenkollagen- $\alpha 1$ -Kette nicht essentiell für die Quervernetzungsreaktion ist.

Aus dem Neutralsalzextrakt von Rattenhaut wurde ein $\alpha 1$ -CB6 isoliert, das nur 4-5 Aminosäuren der nichthelicalen Sequenz aufweist. Die $\alpha 1$ -Kette ist vermutlich durch Gewebsproteasen ziemlich einheitlich abgebaut worden; man findet vorwiegend Asparaginsäure, daneben auch Tyrosin als C-terminale Aminosäure. Die Verhältnisse sind im Vergleich zum $\alpha 1$ -CB6 aus Rattensehnenkollagen in Abb. 14. schematisch wiedergegeben.

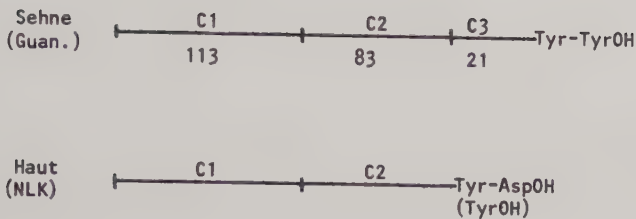


Abb. 14. Schema der Chymotrypsinpeptide von $\alpha 1$ -CB6 aus Rattensehnenkollagen (Guanidinextrakt) und Rattenhautkollagen (Neutralsalzextrakt).

Im Fall des $\alpha 1$ -CB6 aus Rattensehnenkollagen wird die Tyr-Asp-Bindung zwischen C2 und C3 von Chymotrypsin gespalten. Da Chymotrypsin jedoch keine Exopeptidase ist, wird der Asparaginsäurerest des $\alpha 1$ -CB6 von Haut-NLK nicht abgespalten.

Das N-terminale Ende der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen ist nach den vorliegenden Untersuchungen weniger proteasesensitiv als der C-Terminus. Frühere Ergebnisse in bezug auf das Fehlen von 4 Aminosäuren am N-terminalen Ende der $\alpha 1$ -Kette von NLK aus Rattenhaut (36) im Vergleich zum NLK der Sehne (37) konnten bestätigt werden. Da jedoch nach Harnstoffextraktion der Rattenhaut dieser Unterschied nicht auftritt, muß er als Extraktionsartefakt angesehen werden.

Beim Vergleich von BrCN-Peptiden aus Haut-, Sehnen- und Knochenkollagen konnte kein Hinweis auf ein zweites Genprodukt erhalten werden, wie es z.B. für die $\alpha 1$ -Kette von Hühnerknorpelkollagen (39) nachgewiesen ist. Als Gewebefunterschiede wurden nur Differenzen in hydroxylierten Aminosäuren gefunden. Diese Hydroxylierung erfolgt erst nach dem Einbau von Prolin bzw. Lysin in die Polypeptidkette. Für

das 4-Hydroxyprolin können aufgrund der großen Menge keine Angaben über Unterschiede gemacht werden. Dahingegen weist das $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen gegenüber den analogen Peptiden aus Haut- und Knochenkollagen einen zusätzlichen 3-Hydroxyprolinrest auf. Über die Rolle der Hydroxylierung von Prolin (in 3- und 4-Stellung) im Kollagen sind bislang keine klaren Vorstellungen entwickelt worden. Für die sehr selten vorkommende Hydroxylierung in 3-Stellung des Prolin existiert womöglich kein spezifisches Enzym (11).

Beim Vergleich der $\alpha 1$ -Ketten von Rattenhaut- und Knochenkollagen fällt der erhöhte Hydroxylysin-Gehalt im Knochenkollagen auf. Er ist nicht mit einer entsprechenden Zunahme an Kohlenhydratkomponenten verbunden, wie dies bei Rinderbasalmembran- und Hühnerknorpelkollagen (29), (30) der Fall ist. Da zwei der Hydroxylysinreste in nichthelicalen Regionen nachgewiesen werden konnten, besteht die Möglichkeit, daß die zusätzliche Hydroxylierung von Lysin eine Rolle bei der Quervernetzung spielt. Diese Ansicht wird durch die Tatsache unterstützt, daß in den Kollagenen von harten Bindegewebe wie Knochen und Dentin eine Zunahme von Hydroxylysin in Quervernetzungs-komponenten gefunden wird (40), (41).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Hydroxylysinmangelkrankheit, eine selten beobachtete Kollagenkrankheit beim Menschen (42). Mit einem sehr geringen Gehalt an Hydroxylysin ist eine deutlich stärkere Dehnbarkeit der Haut dieser Patienten und eine Zunahme an löslichem Kollagen verbunden.

Die Ursache für den Mangel an Hydroxylysin dürfte in einem Defekt der spezifischen Lysinhydroxylase zu suchen sein. Entsprechend diesen Ergebnissen sollte man für den Rattenknochen eine erhöhte Lysinhydroxylase-Aktivität annehmen.

Damit könnte der Rattenknochen eine geeignete Quelle für die Isolierung des Enzyms darstellen.

Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Lokalisierung von zwei zusätzlichen Hydroxylysinresten im $\alpha 1$ -CB1 und im $\alpha 1$ -CB6-C3 von Rattenknochenkollagen. Bisher wurde für die Spezifität der Lysinhydroxylase eine Lys-Gly-Sequenz angegeben (43), (11). Diese Voraussetzung ist jedoch keinesfalls für die Lysinreste in den nichthelicalen Bereichen des N- und C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen gegeben. Somit könnte die Lokalisierung weiterer zusätzlicher Hydroxylysinreste in der $\alpha 1$ -Kette von Rattenknochenkollagen die Kenntnis über die Spezifität der Lysinhydroxylase erweitern.

II. IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

C.II.1. Charakterisierung der Spezifität der Immunantwort des Kaninchens gegen Rattenhaut-NLK durch passive Hämagglutination

Als Immuntier für alle nachfolgenden Untersuchungen diente das Kaninchen. In der ersten Injektion wurde den Tieren natives NLK von Rattenhaut in komplettem Freundschens Adjuvans injiziert (Primärantwort). Nach 84 Tagen erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von NLK ohne Adjuvans (Sekundärantwort). Die erhaltenen Antiseren wurden mit Hilfe der passiven Hämagglutination (44) charakterisiert. Der Einsatz dieser sensitiven Technik war notwendig, weil weder mit nativem noch mit denaturiertem Kollagen in der Geldiffusion ein Präzipitat zu erzielen war.

Bei der Methode der passiven Hämagglutination werden tannierte Erythrozyten verwendet, die mit den verschiedenen großen BrCN-Peptiden der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Haut-NLK beladen sind.

Das Titrationsresultat für Seren der Sekundärantwort ist in Tabelle 10. zusammengestellt.

Die höchsten Titer wurden für $\alpha 1$ -CB6 und $\alpha 2$ -CB5 erhalten, die C-terminalen BrCN-Peptide von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette. Deutlich niedriger lagen die Titer für Peptide aus den zentralen (helicalen) Bereichen des Moleküls. Das gleiche Bild und praktisch gleiche Titer waren in der Primärantwort erhalten worden (nicht gezeigt). Im Prinzip sind diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit denen für Antiseren, die nach multiplen Injektionen erhalten worden waren (15), (23).

Tabelle 10. Passive Hämagglutination. Mittlerer Titer der Sekundärantwort von Kaninchen (5 Tiere in jeder Gruppe) für BrCN-Peptide von Rattenhautkollagen in Antiseren gegen natives und denaturiertes NLK und gegen $\alpha 1$ -Ketten.

Immunogen	$\alpha 1$ -CB3	$\alpha 1$ -CB6	Titer * für $\alpha 1$ -CB7	$\alpha 1$ -CB8	$\alpha 2$ -CB3	$\alpha 2$ -CB4	$\alpha 2$ -CB5
NLK (nativ)	0,6±0,9	9,8±1,8	4,0±1,6	2,0±0,6	5,3±2,1	2,0±0,8	7,4±2,1
NLK (denat.)	< 1,0	1,2±1,0	2,7±2,0	4,2±2,1	7,2±1,8	4,7±2,2	6,1±2,1
$\alpha 1$ -Kette	< 1,0	1,2±1,1	2,6±0,8	1,3±1,3	2,4±1,1	0,6±0,5	2,6±0,7

* ($-2 \log$)±SD. Reziproke Verdünnung des Antiserums, die gerade noch positive Agglutination verursacht. Mittelwerte aus 4 Antiseren.

Die Titer der passiven Hämagglutination können ein ungefähres Bild der relativen Stärke der Immunantwort (bzw. Antikörperkonzentration) geben, wenn Informationen über die Verteilung zwischen IgM- und IgG-Antikörpern vorliegen. Im Kaninchen zeigt Immunglobulin M gegenüber Immunglobulin G eine 100 bis 200fach stärkere Agglutinationsaktivität auf Gewichtsbasis (45). Das gleiche Resultat wurde für Anti-kollagenseren erhalten (46). Aus diesem Grunde ist es für eine einzelne AD von Bedeutung zu untersuchen, ob die Agglutination vorwiegend von IgM oder von IgG verursacht wird.

Deshalb wurden die IgM- und IgG-Antikörper der einzelnen Antiseren gegen Rattenhaut-NLK an Sephadex G-200 separiert und in der passiven Hämagglutination untersucht. In Tabelle 11. sind die Ergebnisse für einzelne BrCN-Peptide zusammengefaßt. In Seren der Sekundärantwort sind mit einer Ausnahme ($\alpha 2$ -CB5) die IgG-Titer höher als die IgM-Titer. Dagegen liegen in der Primärantwort die IgM-Titer deutlich über den IgG-Titern, mit Ausnahme der Antwort gegen $\alpha 1$ -CB6, wo beide Titer gleich hoch sind. Dies entspricht der generellen Erfahrung, daß in Kaninchen die IgM-Aktivität in frühen Phasen der Immunantwort stärker ist als in späteren Phasen (47), (48), (49), (50). Ein Vergleich der Titer der Primärantwort und der Sekundärantwort mit den Titern der Tabelle 10. für NLK (nativ) zeigt prinzipiell das gleiche Bild.

Wenn für das $\alpha 1$ -CB6 in der Primärantwort gleich hohe Titer für IgG und IgM erhalten werden, so ist die höhere Agglutinationsaktivität von IgM zu berücksichtigen. Das Immunglobulin G stellt die Hauptmenge der gebildeten Antikörper dar. Unabhängig davon, ob IgG- oder IgM-Antikörper untersucht wurden, waren die Titer gegen $\alpha 1$ -CB6 am stärksten. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das $\alpha 1$ -CB6 eine wichtige

antigene Determinante aufweist.

Tabelle 11. Passive Hämagglutination. Verteilung der agglutinierenden Aktivität gegen BrCN-Peptide von Rattenhautkollagen zwischen IgG- und IgM-Antikörpern.

Kaninchen- antikörper gegen NLK (nativ)		Titer * für			
		$\alpha 1\text{-CB6}$	$\alpha 1\text{-CB7}$	$\alpha 2\text{-CB3}$	$\alpha 2\text{-CB5}$
Primär- antwort	IgG	$9,6 \pm 1,4$	$0,9 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,7$	$3,9 \pm 1,8$
	IgM	$9,4 \pm 1,1$	$4,5 \pm 1,1$	$5,3 \pm 1,7$	$7,6 \pm 1,1$
Sekundär- antwort	IgG	$9,3 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,7$	$2,9 \pm 1,6$	$3,9 \pm 2,1$
	IgM	$6,5 \pm 3,1$	$2,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,1$	$5,8 \pm 3,2$

* $(-2 \log) \pm \text{SD}$. Reziproke Verdünnung des Antiserums, die gerade noch positive Agglutination verursacht. Mittelwert aus 4 Antiseren.

Die Agglutination mit $\alpha 1\text{-CB6}$ ist, wie schon früher gezeigt wurde (15), streng spezifisch für dieses Peptid. In Inhibitionstesten (siehe folgendes Kapitel) kann nur $\alpha 1\text{-CB6}$ und keines der anderen BrCN-Peptide die Agglutination verhindern. Das gleiche Ergebnis wurde bei Untersuchungen der Antiseren dieser Arbeit gefunden (nicht gezeigt). In den folgenden Untersuchungen wurden deshalb die Seren oder die IgG- bzw. IgM-Antikörper in Agglutinationstesten mit $\alpha 1\text{-CB6}$ -Erythrozyten verwendet, ohne daß Antikörper, die spezifisch mit

anderen Peptiden, aber nicht mit $\alpha 1$ -CB6 reagieren, durch Immunadsorption abgetrennt wurden.

C.11.2. Strukturelle Untersuchungen der antigenen Determinante an $\alpha 1$ -CB6

Die ersten Untersuchungen wurden mit der Agglutinationstechnik durchgeführt. Dazu wurden die Erythrozyten mit $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK oder $\alpha 1$ -CB6 aus dem Guanidinextrakt der Sehne oder C1 bzw. C2 von $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK beladen und gegen Serumverdünnungsreihen titriert. Für zwei Antisera sind die erhaltenen Titer in Tabelle 12. angegeben.

Tabelle 12. Passive Hämagglutination. Reziproke Agglutinationstiter von Kaninchenantisera gegen Haut-NLK (nativ) für $\alpha 1$ -CB6 verschiedener Länge und entsprechende chymotryptische Peptide.

Serum Nr.	Titer* für			
	$\alpha 1$ -CB6 Haut (NLK)	$\alpha 1$ -CB6 Sehne (Guan.)	C1 Haut (NLK)	C2 Haut (NLK)
478	1024	16	< 2	128
480	256	8	< 2	128

* Reziproke Verdünnung des Antiserums, die gerade noch positive Agglutination verursacht.

Das längere $\alpha 1$ -CB6 aus dem Sehnenkollagen zeigt deutlich schwächere Titer im Vergleich mit dem $\alpha 1$ -CB6 von Haut-NLK, dem Immunogen. Das Peptid C2 aus Haut-NLK weist eine hohe Agglutinationsaktivität auf. Jedoch sind nicht so hohe Titerwerte wie mit dem entsprechenden $\alpha 1$ -CB6 zu erhalten. Das Peptid C1 erwies sich als inaktiv.

Wenn man verschiedene Antigene direkt miteinander vergleichen will, gelangt man mit der Inhibitionstechnik zu einer präziseren Aussage als mit der Agglutination. Zu diesem Zweck wurden tannierte Erythrozyten mit $\alpha 1$ -CB6 beladen und die Antikörpertiter der Seren bestimmt. Die Antikörper wurden dann auf 8 agglutinierende Einheiten (a.u.) verdünnt (d.h. bei einem Titer von 1:512 entsprechen 8 a.u. einer Verdünnung von 1:64). Diese konstante Antikörpermenge wurde mit dem Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Nach Zugabe von Erythrozyten wurde diejenige Inhibitorkonzentration bestimmt, die gerade die Agglutination verhindert: Ein Inhibitor ist umso aktiver je geringer die benötigte Konzentration ist.

Mit dieser Technik verläuft die Reaktion von Antigen (Inhibitor) und Antikörper in flüssiger Phase (primäre Antigen-Antikörper-Reaktion) und ist nicht von sekundären Faktoren, wie z.B. Brückenbildung zwischen Erythrozyten, abhängig. Zum weiteren ist ein Vergleich von serologischen Aktivitäten verschiedener Inhibitoren auf molarer Basis möglich.

Aus diesem Grunde wurde das Resultat, das durch die Agglutination erhalten worden war (vgl. Tabelle 12.), mit der Inhibitionstechnik wiederholt. Als weiterer Inhibitor wurde das C2 von Sehnenkollagen eingesetzt (Tabelle 13.).

Aus Tabelle 13. ist zu ersehen, daß das $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK die IgG-Antikörper der Sekundärantwort am sensitivsten inhi-

Tabelle 13. Hämagglutinations-Inhibitionstest mit $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut- und Sehnenkollagen und entsprechenden Chymotrypsinpeptiden.

Kaninchen- antikörper gegen NLK (nativ)	Inhibitor (Mol/l) *				
	$\alpha 1$ -CB6 Haut (NLK)	$\alpha 1$ -CB6 Sehne (Guan.)	C1 Haut (NLK)	C2 Haut (NLK)	C2 Sehne (Guan.)
IgG, sekundär	1,04	> 100	> 400	6,15	>50
IgG, primär	6,2	***	> 400	17,2	-
IgM, primär	2,35	-	> 400	150	-

* Mittlere Minimalkonzentration, die 8 a.u. von Kaninchen-antikörpern inhibiert. Mittelwerte aus 3-4 Antiseren.

*** Nicht getestet

bieren kann. Für das IgG der Primärantwort ist eine um den Faktor 6 höhere Inhibitorkonzentration notwendig. Das IgM der Primärantwort ist dem IgG der Sekundärantwort vergleichbar (Faktor 2). Es ist jedoch weit weniger sensitiv bei dem serologisch aktiven Peptid C2 von Haut-NLK. Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen mit dem IgG der Sekundärantwort durchgeführt.

Von den Chymotrypsinpeptiden des $\alpha 1$ -CB6 von Haut-NLK trägt das C2 die alleinige Aktivität, das C1 ist praktisch inaktiv. Das C2 ist jedoch um den Faktor 6 weniger aktiv als das $\alpha 1$ -CB6. Bei einem Vergleich von $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK mit dem längeren $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen zeigt dieses Peptid eine mindestens 100-fach geringere Aktivität. Nach Chymotrypsinabbau des $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen weist das chymotryptische Peptid C2 ebenfalls keine serologische Aktivität auf (mindestens 10-fach geringer als das C2 von Haut-NLK).

Um die antigene Determinante auf dem $\alpha 1$ -CB6-C2 näher einzugrenzen, wurden die tryptischen Peptide des C2 von Haut-NLK mit der Hämagglutinations-Inhibitionstechnik untersucht (vgl. Tabelle 14.).

Tabelle 14. Hämagglutinations-Inhibitionstest mit den Trypsinpeptiden von $\alpha 1$ -CB6-C2 aus Haut-NLK.

Inhibitor	$\mu\text{Mol/l}^*$
C2	7,8
C2-T5	18,8
C2-T1	> 400
C2-T2	> 400
C2-T3	> 400
C2-T4	> 200

* Mittlere Minimalkonzentration, die 8 a.u. von Kaninchenantikörpern inhibiert. Mittelwerte aus 4 Antiseren.

Das terminale tyrosinhaltige Peptid C2-T5 (vgl. Tabelle 6.) trägt die alleinige serologische Aktivität. Sie liegt allerdings wiederum um den Faktor 2 unter derjenigen von C2.

C.11.3. Immunogene und tolerogene Eigenschaften der antigenen Determinante an $\alpha 1$ -CB6

In den bisherigen Untersuchungen waren die Kaninchen mit nativem NLK von Rattenhaut immunisiert worden. Die AD auf dem $\alpha 1$ -CB6 von NLK war mit Antikörpern aus den erhaltenen Seren an der isolierten $\alpha 1$ -Kette und an kleineren Fragmenten nachweisbar. In diesem Zusammenhang war die Frage interessant, ob die Antikörperantwort auch mit derartigen Ketten, bzw. Fragmenten induzierbar ist. Dazu wurden Kaninchen mit denaturiertem NLK (Gemisch von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten) und mit $\alpha 1$ -Ketten unter gleichen Bedingungen wie mit nativem Kollagen immunisiert. Im Vergleich zu den Titern nach Immunisierung mit NLK (nativ) waren die Titerwerte für $\alpha 1$ -CB6 signifikant reduziert (vgl. Zeile 2 und 3 in Tabelle 10.). Die Titer der anderen BrCN-Peptide waren dagegen nicht oder nur geringfügig beeinflusst.

In Erweiterung dieser Untersuchungen wurden Kaninchen mit β -Komponenten immunisiert ($\beta 11$ -zwei kovalent gebundene $\alpha 1$ -Ketten und $\beta 12$ -kovalent gebundene $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette). Die β -Komponenten haben ein höheres Molekulargewicht als die α -Ketten. Indem das Molekulargewicht des Kollagenmoleküls zu zwei Drittel erreicht wird, sollte es möglich sein, den Einfluß des Molekulargewichts auf die Immunantwort gegen $\alpha 1$ -CB6 zu klären. Andererseits wurde Kooperationsphänomenen, wie sie z.B. bei Hapten-Trägerproteinen bekannt sind, Rechnung getragen. Sie könnten zwischen zwei $\alpha 1$ -Ketten bzw. der $\alpha 1$ - und der $\alpha 2$ -Kette existieren.

Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Vorimmunisierung mit β -Komponenten die Immunantwort gegen $\alpha 1$ -CB6 im Sinne einer Toleranz beeinflusst hat. Aus diesem Grunde wurde das bisherige Immunisierungsschema geändert.

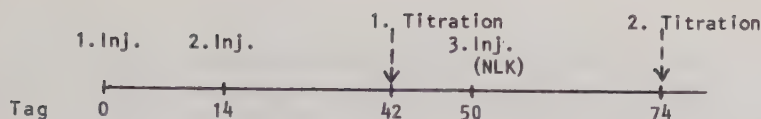


Abb. 15. Schema für die Immunisierung von Kaninchen mit β -Komponenten (β 11 und β 12).

Die 1. Injektion erfolgte mit β 11 oder β 12 in kompletten Freundschens Adjuvan s (KFA) intradermal. In der 2. Injektion nach 14 Tagen wurde das gleiche Immunogen ohne Adjuvans intraperitoneal gegeben. Mit der 1. Blutabnahme nach 42 Tagen wurden die Titer der Sekundärantwort bestimmt. In der 3. Injektion wurde generell NLK + KFA intradermal gegeben. Nach 74 Tagen erfolgte die 2. Blutabnahme und Titration.

Zu diesen Immunisierungsversuchen wurden zwei Kontrollen durchgeführt. In der 1. Kontrollgruppe erhielten die Kaninchen zwei Injektionen mit nativem Rattenhaut-NLK. In der 2. Kontrolle (zur 3. Injektion) wurde den Tieren ohne Vorbehandlung lediglich eine Injektion mit NLK (nativ) gegeben. Der Test wurde mit α 1-CB6-Erythrozyten in der Agglutination ausgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 15. wiedergegeben.

Die Immunisierung mit β -Komponenten ergab analog wie mit α -Ketten keinen starken α 1-CB6-Titer. In der entsprechenden Kontrolle (I) waren die Titer so hoch wie üblich. Die Vorbehandlung hatte jedoch einen Effekt auf die Immunantwort gegen α 1-CB6. Der Versuch einer nachfolgenden Stimulierung mit NLK ergab nur einen geringen Anstieg der Titerwerte. In der entsprechenden Kontrolle (II) wurde ein hoher α 1-CB6-Titer erhalten.

Tabelle 15. Passive Hämagglutination. Agglutinationstiter gegen $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut-NLK nach Immunisierung mit β -Komponenten und nativem NLK. Gruppengröße: 5 Kaninchen (vgl. Immunisierungsschema Abb. 15.)

Immunogen (1. u. 2. Injektion)	1. Titration Titer * der Sekundärant- wort	2. Titration Titer * nach 3. Injektion mit NLK
$\beta 11$	$1,3 \pm 1,3$	$2,8 \pm 2,4$
$\beta 12$	$2,1 \pm 0,9$	$3,0 \pm 2,4$
NLK (nativ)		
Kontrolle I	$8,7 \pm 1,2$	-
Kontrolle II **	-	$10,3 \pm 1,6$

** $(-^2 \log) \pm SD$. Reziproke Verdünnung des Antiserums, die gerade noch positive Agglutination verursacht.

*** Nur 3. Injektion mit NLK (nativ)

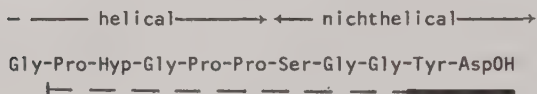
C.11.4. Diskussion

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, weist das $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut-NLK eine wichtige antigene Determinante auf. Dies entspricht dem Ergebnis früherer Untersuchungen (15), (23). Die $\alpha 1$ -CB6-Determinante wird von Kaninchen bereits sehr früh beantwortet, und die Immuntiere zeigen in diesem Fall sogar eine frühe IgG-Antwort. Die beschriebene Protease-sensitivität (15) dieser Determinante hatte den Hinweis auf eine Lokalisierung am C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette gegeben. Der Beweis dafür konnte in vorliegender Arbeit erbracht werden. Bei Fragmentierungen war jeweils das C-terminale Peptid serologisch aktiv. Die anderen enzymatischen Fragmente des $\alpha 1$ -CB6 waren praktisch inaktiv. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, daß am $\alpha 1$ -CB6 mehrere AD existieren.

Weitere Angaben über die Struktur der Determinante konnten durch Untersuchungen mit dem längeren $\alpha 1$ -CB6 von Ratten-sehnenkollagen, das serologisch inaktiv war (vgl. Tabelle 13.), erhalten werden. Das $\alpha 1$ -CB6 aus Haut-NLK ist ein verkürztes Produkt des langen $\alpha 1$ -CB6 (vgl. Abb. 14.). Die Verlängerung bedingt einen Verlust der serologischen Aktivität, folglich ist eine freie COOH-Gruppe essentiell für die AD. Das aus dem $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen isolierte Chymotrypsinpeptid C2, das mit Tyrosin endet, wies keine serologische Aktivität auf. Es entspricht dem C2 von Haut-NLK mit Ausnahme, daß der Asparaginsäurerest am C-Terminus fehlt. Folglich kann Tyr-Asp-OH als Minimalsequenz für die untersuchte AD angenommen werden.

Über die maximale Größe der Determinante ist keine genaue Aussage möglich. Sie ist durch 27 Aminosäurereste, die Länge des kleinsten serologisch aktiven Peptides begrenzt. Nach den bisherigen Erfahrungen für Determinanten an verschiedenen

Kollagenen (17), (18), (19) und anderen Proteinen (51), (52), (53) sollte die Größe bei 5-10 Resten liegen. Der Sequenzbereich, den die AD einnehmen könnte, ist in Abb. 16. angegeben. Dabei wird von einer Übereinstimmung in der Sequenz des $\alpha 1$ -CB6 von Kalbshaut- und Rattenhautkollagen in diesem Bereich ausgegangen; dies ist durch die vorliegenden Untersuchungen (vgl. C.1.4.) sehr wahrscheinlich.



fall in der Inhibitionsaktivität zu finden (17), (18), (19). Selbst Pentapeptide zeigen noch volle serologische Aktivität. Vermutlich ist eine bestimmte Konformation für die AD am α 1-CB6 wichtig, die von kleiner werdenden Fragmenten immer schwieriger eingenommen werden kann.

Der progrediente Aktivitätsverlust ist ein charakteristisches Merkmal der untersuchten AD. Eine interessante Relation besteht zur immunogenen Aktivität. Nur mit der nativen Kollagenstruktur kann in Kaninchen eine starke Immunantwort gegen die AD am α 1-CB6 von Haut-NLK ausgelöst werden. Denaturiertes NLK, die isolierte α 1-Kette, β 11 und β 12 sind inaktiv im Auslösen der Antikörperantwort gegen α 1-CB6 im Kaninchen. Die Immunisierungsergebnisse weisen jedoch darauf hin, daß durch die Vorbehandlung mit den Immunogenen β 11 und β 12 partielle Toleranz erzeugt worden ist (vgl. Tabelle 15.).

Diese Abhängigkeit von tolerogenen und immunogenen Eigenschaften von der Konformation des Immunogens hat eine interessante Parallele zu den Untersuchungen von Sela et al. (54). Poly-DL-Alanin ist ein gutes Immunogen, wenn es an Proteine wie RNase oder Humanserumalbumin gekoppelt ist. Poly-DL-Alanin allein ist nicht immunogen, aber ein sehr effektives Tolerogen für Polyalanin-Determinanten auf Poly-DL-Alanin-Proteinen. Es ist jedoch nicht klar, inwieweit hier nur ein Einfluß der Konformation des Immunogens vorliegt.

Falls sich durch weitere Untersuchungen die Annahme einer Toleranzinduktion bestätigen sollte, könnte die AD auf dem α 1-CB6 von Rattenhaut-NLK ein gutes Modell sein, dieses Phänomen auf einer bestimmten strukturellen Ebene näher zu untersuchen. Vorerst wäre zu klären, ob noch kleinere Fragmente als die α 1-Kette (bis zum C2-T5) tolerogen wirken.

Sollte das der Fall sein, könnte man mit Hilfe von synthetischen Peptiden des Endbereiches die antigene Spezifität (charakterisiert im Inhibitionstest) und die tolerogene Aktivität strukturell miteinander vergleichen.

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

Für die $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen konnte vor kurzem am C-Terminus ein nichthelicaler Bereich nachgewiesen (33) und seine Sequenz ermittelt werden (10). An dem sehr gut untersuchten Rattenhautkollagen konnte eine derartige C-terminale Region bislang nicht nachgewiesen werden. Auf Grund der Bedeutung von nichthelicalen Bereichen für die Quervernetzung und die immunogenen Eigenschaften des Kollagens sollte das C-terminale BrCN-Peptid der $\alpha 1$ -Kette von Rattenkollagen strukturellchemisch und immunologisch näher charakterisiert werden.

Der Nachweis des nichthelicalen Bereiches am $\alpha 1$ -CB6 gelang erst nach Extraktion unter denaturierenden Bedingungen. Dadurch werden die bei der Zerkleinerung des Gewebes freigesetzten Proteasen in ihrer Aktivität gehemmt. Für das Ratten-sehnenkollagen wurde eine hohe Ausbeute erreicht, im Fall des Hautkollagens konnte die vollständige nichthelicale Region am C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette nur zu etwa 10 % erhalten werden.

Die Untersuchungen ergaben einen dem $\alpha 1$ -CB6 von Kalbshautkollagen homologen Bereich. Nach Chymotrypsinspaltung konnte ein nichthelicales Peptid $\alpha 1$ -CB6-C3 erhalten werden. Das C3 weist bei einer Länge von 21 Aminosäureresten nur zwei Glycinreste auf und besitzt damit nicht die Voraussetzung für die Ausbildung einer tripelhelicalen Struktur. Die aus Sehnen- und Hautkollagen der Ratte isolierten Peptide hatten die gleiche Aminosäurezusammensetzung.

Vergleicht man die nichthelicalen Bereiche, repräsentiert durch das Peptid C3, von Ratten- und Kalbshautkollagen, so wird mit drei Austauschen innerhalb von 21 Aminosäureresten

eine verhältnismäßig hohe Austauschquote gefunden. Ein Leucin-, ein Alanin- und ein Histidinrest im $\alpha 1$ -CB6-C3 von Kalbshautkollagen sind durch einen Phenyl-, einen Serin- und einen Glutaminsäure- (oder Glutamin-)Rest in der Rattenkollagensequenz ersetzt. Beim Vergleich der helicalen Bereiche von $\alpha 1$ -CB6, repräsentiert durch die Peptide C1 und C2, können auf einer Gesamtlänge von 196 Aminosäureresten gleichfalls nur drei Austausche zwischen Kalbshaut- und Rattenkollagen festgestellt werden.

In Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen ließ sich auch für das N-terminale Ende der $\alpha 1$ -Kette von Rattenhautkollagen eine proteolytische Abspaltung nachweisen. Im Neutralsalz-extrakt der Haut fehlten 4 Aminosäuren am N-Terminus der $\alpha 1$ -Kette. Nach Harnstoffextraktion der Haut konnte das Dipeptid $\alpha 1$ -CB0 und das $\alpha 1$ -CB1 mit 17 Aminosäureresten, wie schon für Rattensehnenkollagen (37) bekannt, isoliert werden.

Als Gewebeunterschiede in den terminalen BrCN-Peptiden von Haut-, Sehnen- und Knochenkollagen wurden nur Differenzen in der Hydroxylierung von Prolin und Lysin festgestellt. Das $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen weist gegenüber den Peptiden von Haut- und Knochenkollagen einen zusätzlichen 3-Hydroxyprolinrest auf. Im $\alpha 1$ -CB1 und im $\alpha 1$ -CB6-C3 aus dem Guanidinextrakt des Knochens wurde Hydroxylysin anstelle von Lysin nachgewiesen.

Aus dem Neutralsalzextrakt der Rattenhaut wurde ein $\alpha 1$ -CB6 isoliert, das das nichthelicale Peptid C3 nicht aufweist. Nach Chymotrypsinspaltung konnten nur die Peptide C1 und C2 isoliert werden. Dieses $\alpha 1$ -CB6 von Haut-NLK ist ein um 20 Aminosäuren verkürztes Produkt des normalerweise langen $\alpha 1$ -CB6; es endet größtenteils mit Asparaginsäure, der ersten Aminosäuren in der Sequenz des C3.

Nur dieses Haut-NLK wurde als Immunogen für die Kaninchen eingesetzt. Durch serologische Untersuchungen wurde gezeigt, daß das $\alpha 1$ -CB6 eine wichtige antigene Determinante aufweist. Das gilt für die Primär- und die Sekundärantwort des Kaninchens. Schon in der Primärantwort zeigen die Antiseren starke Immunglobulin G-Titer für die AD am $\alpha 1$ -CB6 von Rattenhaut-NLK.

Die serologischen Untersuchungen der Abbaupeptide des $\alpha 1$ -CB6 führten zu der Erkenntnis, daß die antigene Determinante C-terminal lokalisiert ist. Die freie Carboxylgruppe der Asparaginsäure ist essentiell für diese Determinante, da das längere $\alpha 1$ -CB6 von Sehnenkollagen keine serologische Aktivität aufweist. Als Minimalsequenz für die untersuchte AD kann Tyr-Asp-OH angenommen werden (vgl. Abb. 16.).

Der successive Verlust der serologischen Aktivität bei kleiner werdenden Fragmenten des $\alpha 1$ -CB6 ist ein Charakteristikum der untersuchten AD. Es legt die Vermutung nahe, daß die Konformation des Immunogens eine gewisse Rolle bei der Immunantwort des Kaninchens spielt.

Obwohl es gelingt, mit der nativen Kollagenstruktur stets eine starke Antikörperantwort gegen das $\alpha 1$ -CB6 von Haut-NLK zu erzielen, ist dies nicht möglich mit α -Ketten und β -Komponenten des Kollagens, die in "random coil"-Struktur vorliegen. Das steht im Gegensatz dazu, daß die Determinante auf diesen Strukturen nachzuweisen ist. Die vorliegenden Untersuchungen deuten auf eine Toleranzinduktion nach Immunisierung mit $\beta 11$ oder $\beta 12$ hin.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

E.1.1. Ausgangsmaterial

Männliche Wistar-Ratten (Gewicht 100-150 g) wurden lathyrisch gemacht, indem vier Wochen lang dem Trinkwasser 0,1 % β -Aminopropionitril-Fumarat (BAPN) zugefügt wurde. Dadurch erhielten die Tiere in diesem Zeitraum etwa 500 mg BAPN. Durch Chloroforminhalation wurden sie getötet und anschließend enthäutet. Die Häute wurden weitgehend von Unterhautfett und Haaren befreit.

Weiterhin wurden die Schwanzsehnen und die Knochen (Ober- und Unterarm, Ober- und Unterschenkel) der Tiere präpariert. Die Knochen mußten durch Entfernen der Enden sauber von Knorpel befreit werden. Danach wurden sie mit 0,35 M EDTA, pH 8,1, sieben Tage lang (täglicher Wechsel der EDTA-Lösung) extrahiert.

Nach Zerkleinern des jeweiligen Gewebes im Fleischwolf (Haut) oder mit einem Mixer (Sehne, Knochen) wurde mit der Extraktion begonnen.

a) NLK-Extraktion

Das Gewebe wurde in der 10-fachen Menge 1 M NaCl, 0,05 M Tris.HCl, pH 7,5 suspendiert und 48 h lang bei 4°C unter Schütteln extrahiert. Durch Filtration über Verbandmull wurde das Gewebe abgetrennt und einer weiteren Extraktion unterworfen. Das Filtrat wurde über Kieselgur (Merck) auf einem Büchner-Trichter von Fett befreit. Nach Erhöhen der NaCl-Konzentration auf 20% fiel das Kollagen aus, am nächsten Tag war die Ausfällung vollständig.

Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation 1 h bei 32 000 x g gesammelt, mit einer 20%-igen NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in dest. Wasser in Lösung gebracht (1-2 Tage bei 4°C). Die erneut über Kieselgur gereinigte Lösung wurde mit 0,5 M Essigsäure auf pH 4 eingestellt. Durch Zugabe von festem NaCl bis auf 5 % wurde das Kollagen ausgefällt und für 30 min. bei 20 000 x g abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 0,5 M Essigsäure gelöst, gegen 1%-ige Essigsäure dialysiert und nachfolgend lyophilisiert.

b) Extraktion unter denaturierenden Bedingungen

Es wurde mit der 5-fachen Menge 8 M Harnstoff (Haut) oder 6 M Guanidin • HCl, pH 8 (Sehne, Knochen) extrahiert. Hierbei wurde die Zerkleinerung des Gewebes schon in der entsprechenden Lösung vorgenommen, um die Gewebsproteasen möglichst früh zu denaturieren. Nach der Extraktionszeit von 2 h wurde das Gewebe 1 h lang bei 32 000 x g abzentrifugiert und die Lösung, wenn notwendig, über Kieselgur von Fett befreit. Darauf wurden Harnstoff, bzw. Guanidin durch Dialyse gegen Kettentrennungspuffer (0,06 M Natriumacetat, pH 4,8) entfernt. Die erhaltenen Lösungen wurden an CM-Cellulose chromatographiert.

E.1.2. Bromcyan-Spaltung

Die Spaltung der α 1-Ketten mit BrCN (Schuchardt) wurde nach der Methode von Bornstein et al. (31) durchgeführt. Proben von 100 mg lyophilisierten α 1-Ketten wurden in 10 ml 1 N HCl gelöst und mit 100 mg BrCN versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei 30°C wurde das Gemisch nach Verdünnen mit dest. Wasser lyophilisiert; in diesem Fall konnte das Di pep-

tid α 1-CB0 nach der Bio-Gel P-4-Trennung (vgl. Abb. 3.) aus dem Salzpeak isoliert werden. In den meisten Fällen jedoch wurde das Peptidgemisch an einer Bio-Gel P-2-Säule entsalzt und danach lyophilisiert.

E.1.3. SDS-Diskelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der α 1-Ketten und des α 1-CB6 wurde die Methode von Furthmayr und Timpl (27) angewendet. Als Kammerpuffer diente 0,1 M Phosphat, pH 7,2 und 0,1 % SDS. Die Proben wurden in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2 mit 0,2 % SDS und 2 M Harnstoff aufgenommen und für 30 Min. bei 50°C denaturiert. Es wurden 0,02 - 0,04 mg Protein aufgetragen und die Elektrophorese bei 6 mA pro Gelröhrchen für 4 - 6 h ausgeführt. Als Polyacrylamid-Gele (Acrylamid und Methylenbisacrylamid, Serva) wurden 5%-ige Gele für die α -Ketten und 7,5%-ige Gele für die BrCN-Peptide verwendet. Die Anfärbung mit 0,25 % Comassie Brilliant Blue in 20 % Trichloressigsäure dauerte 2 h, anschließend wurde 18-20 h mit 7 % Essigsäure der überschüssige Farbstoff entfernt.

Für die Untersuchung der verschiedenen α 1-CB6-Präparate (Abb. 5.) wurde das Verfahren nach Laemmli (55) verwendet. Die Substanzen wurden in 8 M Harnstoff, 2 % SDS, 0,05 M Tris.HCl, pH 6,8, gelöst. Das Sammelgel (3 %) hatte eine Länge von 1 cm, das Trenngel (10 %) war 10 cm lang. Als Elektrodenpuffer wurde 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS, 0,025 M Tris.HCl, pH 8,3, verwendet. Die Laufzeit betrug 1 h bei 1 mA/Gelröhrchen und anschließend 2 1/2 h bei 2,2 mA/Gelröhrchen. Angefärbt wurde mit Comassie Brilliant Blue in 50 % Methanol, 0,5 % Essigsäure. Das Entfärben erfolgte mit 7 % Essigsäure.

E.1.4. Ionenaustausch-Chromatographie

a) CM-Cellulose-Chromatographie

Die Trennung der α -Ketten wurde nach Piez et al. (25) an CM-Cellulose, pH 4,8, durchgeführt. Die bei 40°C thermostatisierte Säule (2,5 x 15 cm), gefüllt mit CM-Cellulose (Whatman, microgranular CM 52), wurde mit Startpuffer 0,06 M Natriumacetat, pH 4,8 äquilibriert. 150 - 200 mg NLK wurden in 50-60 ml Startpuffer aufgenommen, für 30 Min. bei 40°C denaturiert und auf die Säule aufgetragen. Von den Harnstoff-, bzw. Guanidinextrakten wurde eine adäquate Lösungsmenge entsprechend behandelt. Die Ketten wurden aufsteigend mit einem linearen Gradienten von 450 ml Startpuffer und 450 ml Limitpuffer (Startpuffer + 0,1 M NaCl) eluiert. Bei einer Pumpengeschwindigkeit von 200 ml/h wurden 12 Fraktionen/h aufgefangen. Die Absorption des Eluats wurde kontinuierlich bei 230 nm mit einem Beckman DB Spektralphotometer gemessen.

Die β -Komponenten wurden nach einer Molekularsiebchromatographie an Agarose A 1,5 (0,002 M CaCl_2 , 0,1 M Tris.HCl, pH 7,5) unter den oben beschriebenen Bedingungen an CM-Cellulose rechromatographiert.

c) Phosphocellulose-Chromatographie

Die beschriebenen Trennungen wurden an einer auf 38°C thermostatisierten Säule (1,0 x 7 cm) durchgeführt, gefüllt mit Phosphocellulose (Whatman P11). Sie waren eine Modifikation der Methode von Bornstein und Piez (26). Die nach Denaturieren (30 Min. bei 40°C) aufgetragenen Peptide wurden aufsteigend mit folgenden konkaven Gradienten eluiert:

100 ml Startpuffer (0,001 Natriumacetat, pH 3,6) in einem
100 ml Becherglas,
100 ml Limitpuffer (Startpuffer + 0,2 bis 0,5 M NaCl) in
einem 150 ml Erlenmeyer.

Der verwendete Gradient ist jeweils angegeben. Bei einer
Pumpengeschwindigkeit von 50 ml/h wurden 10 Fraktionen/h
gesammelt.

c) Chromatographie an Dowex 50 X-2

Das Peptidgemisch wurde in dest. Wasser auf die Säule (1,0 x
6 cm) aufgetragen, die mit Dowex 50 X-2 (200-400 mesh, H⁺-
Form) gefüllt war. Anschließend wurde das Dipeptid PCA-Hse
aufgrund fehlender freier Aminogruppe mit 40 ml dest. Wasser
eluiert. Durch Elution mit 0,1 % Ammoniak wurden die Peptide
mit freien Aminogruppen erhalten.

E.1.5. Molekularsiebchromatographie

a) Gelchromatographie an Bio-Gel P-4

Die Trennungen an Bio-Gel P-4 (200-400 mesh, Bio-Rad Labora-
tories) wurden an einer 3,5 x 138 cm-Säule bei Raumtempera-
tur durchgeführt. Die Peptide wurden bei einer Pumpengeschwin-
digkeit von 80 ml/h in 0,1 M Essigsäure eluiert. Das Eluat
wurde bei 230 nm gemessen und in 12 ml-Fraktionen aufge-
fangen. Außerdem wurden Trennungen an einer Bio-Gel P-4-
Säule (1,6 x 106 cm) in 0,1 M Essigsäure ausgeführt. Hier
betrug die Pumpengeschwindigkeit 18 ml/h, es wurden 6 Frak-
tionen/h gesammelt.

b) Gelchromatographie an Bio-Gel P-10 (200-400 mesh)

Die Säulenmaße betrugen 1,5 x 120 cm. Eluiert wurde mit 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 bei 38°C. Der Durchfluß betrug 18 ml/h, das Eluat wurde in 3 ml-Fraktionen aufgefangen.

c) Gelchromatographie an Bio-Gel P-150

An einer bei 38°C thermostatisierten Säule (3,5 x 88 cm) wurden die BrCN-Peptide der α 1-Kette und C1 und C2 von α 1-CB6 aus Haut-NLK in 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 aufgetrennt. Die Pumpengeschwindigkeit betrug 13 ml/h, es wurden 3 Fraktionen/h gesammelt.

d) Gelchromatographie an Sephadex G-50

Die Trennungen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen des gleichen Puffers vorgenommen. Die Säulen waren bei 38°C thermostatisiert. Bei der Elution in 0,03 M Natriumacetat pH 4,5 (Säule: 2,0 x 140 cm) betrug der Durchfluß 21 ml/h (5 Fraktionen/h). Die Elutionsgeschwindigkeit in 0,05 M Natriumacetat, pH 4,5 (Säule: 2,0 x 144 cm) war 20 ml/h (4 Fraktionen/h).

e) Gelchromatographie an Bio-Gel P-2 (200-400 mesh)

Die aufgetragenen Peptide wurden von der Säule (1,5 x 115 cm) bei Raumtemperatur in 0,1 M Essigsäure mit einer Pumpengeschwindigkeit von 13 ml/h eluiert. Es wurden 6 Fraktionen/h gesammelt.

f) Entsalzung an Bio-Gel P-2 (100-200 mesh)

Alle Peptide wurden an Bio-Gel P-2-Säulen passender Größe in 0,1 M Essigsäure entsalzt. Bei einer Säulengröße von 3 x 25 cm betrug der Durchfluß (ohne Pumpe) 500 ml/h.

E.1.6. Enzymatische Spaltungen

a) Chymotrypsinspaltung

90 mg Peptid wurden in 30 ml 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 7,9, gelöst und 30 Min. lang bei 40°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 1,8 mg α -Chymotrypsin (Enzym: Substrat = 1:50) zugegeben (1 mg Enzym gelöst in 1 ml 0,02 % CaCl_2 -Lösung) und für 40 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Enzymbehandlung durch Ansäuern mit Eisessig wurde das Abbaugemisch lyophilisiert. α -Chymotrypsin (Worthington, 50,9 U/mg).

b) Trypsinspaltung

Die Trypsinspaltung wurde mit TPCK-behandeltem Trypsin (Worthington) ausgeführt. Die Umsetzung mit TPCK (Tosyl-amido-2-phenyläthyl-chlormethylketon, Mann Research) wurde zur Chymotrypsin-Inaktivierung durchgeführt. 100 mg Peptid wurden in 50 ml 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 7,9, in Lösung gebracht, 30 Min. lang bei 37°C denaturiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurde 1 mg Trypsin (Enzym: Substrat = 1:100) in 1 ml 0,001 M CaCl_2 zugefügt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde durch Ansäuern mit Eisessig gestoppt und das Gemisch lyophilisiert.

E.1.7. Aminosäureanalyse und Bestimmung der Kohlenhydratkomponenten *)

Für die Aminosäureanalyse wurden 0,2 - 1,5 mg Protein in 1 ml 6 N HCl unter Stickstoff 24 h lang bei 110°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Homoserin enthaltende Peptide wurden mit 2%-igem Piperidin 1 h bei 37°C behandelt. Die Analysen wurden im Einsäulenverfahren mit dem automatischen Aminosäureanalysator Biochrom BC 200 (Bio-Cal, München) durchgeführt. Die errechneten Werte für Serin und Threonin wurden nach Rauterberg und Kühn (56) mit den Faktoren 1,21 bzw. 1,08 korrigiert.

Zur Bestimmung der Kohlenhydratkomponenten wurde 1 mg Protein (α 1-Kette) in 0,5 ml 2 N NaOH für 20 h bei 105°C in einem Polypropylenröhrchen unter Stickstoff hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit HCl neutralisiert. Nach der Methode von Spiro (57) wurden die Glycopeptide am Aminosäureanalysator identifiziert. Durch Verlängerung der Laufzeit des B-Puffers (pH 4,22) erschien Glc-Gal-Hyl nach dem Tyrosin, Gal-Hyl mit dem C-Puffer (pH 6,09) deutlich vor dem freien Hydroxylysin und dem Histidin. Indem man die Werte für die beiden Glycopeptide mit dem freien Hydroxylysin ins Verhältnis setzt, erhält man die Anzahl der Glycopeptidreste pro α 1-Kette (bei Kenntnis der Zahl der Hydroxylysinreste nach saurer Hydrolyse).

E.1.8. Hydrazinolyse

1,6 bzw. 4 mg Peptid wurden mit 1 ml wasserfreiem Hydrazin (Roth, Karlsruhe) unter Stickstoff für 6, 20 oder 40 h bei

*) Herrn W. Straßhofer danke ich für die Ausführung der Aminosäureanalysen.

80°C erhitzt. Das überschüssige Hydrazin wurde anschließend im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure entfernt. Die trockene Substanz wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und auf eine Säule (1 x 4 cm) mit Amberlite IRC-50 (Serva) in der H⁺-Form gegeben. Zunächst wurde mit 20 ml Wasser eluiert, um die sauren und neutralen Aminosäuren zu erhalten. Zur Gewinnung der basischen Aminosäuren wurde darauf mit 20 ml 0,1 M Ammoniumacetat, pH 7,0, eluiert. Die vereinigten Eluate wurden lyophilisiert und die Aminosäuren am Aminosäureanalysator identifiziert.

E.1.9. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die zu untersuchenden Peptide wurden nach Rauterberg und Kühn (32) gegen 0,25 M Citratpuffer, pH 3,7 dialysiert und zunächst 20 Min. lang bei 36°C denaturiert. Die Temperatur der Lösung wurde dann so weit erniedrigt, bis sich ein erster Anstieg der optischen Drehung bei 405 nm zeigte. Anschließend wurde bei 10-15°C (je nach Peptidlänge) mehrere Tage lang renaturiert.

Die renaturierte Lösung wurde bei 4°C gegen 0,1 % Essigsäure dialysiert. Die Ausfällung der Segmente erfolgte durch Dialyse gegen 0,4%-ige ATP-Lösung (Serva), pH 2,8 bei 4°C. Nach Aufbringen der Segmentsuspension auf einen Objektträger (Blinde mit einem Kollodium-Kohlefilm bedeckt) wurde mit Phosphorwolframsäure angefärbt und mit Uranylacetat nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden am Elmiskop I (Siemens und Halske, Berlin) bei einer Strahlspannung von 80 kV ausgeführt.

E.11.1. Immunisierung der Kaninchen

Für die Immunisierungsexperimente wurden 2,5 - 3 kg schwere, erwachsene Kaninchen verwendet. Für die 1. Injektion wurden 5 mg Rattenhaut-NLK in 2 ml 0,05 % Essigsäure mit dem gleichen Volumen an komplettem Freundschens Adjuvans (KFA) gut durchgemischt. Diese Lösung wurde den Tieren intracutan an 3-4 Stellen der Rückenhaut injiziert. Die 1. Blutabnahme zur Bestimmung der Titer der Primärantwort erfolgte nach 24 Tagen. 84 Tage nach der 1. Injektion erhielten die Tiere eine 2. Injektion mit 10 mg NLK in 4 ml 0,05 % Essigsäure ohne KFA intraperitoneal. Die 2. Blutabnahme erfolgte 10 Tage nach der 2. Injektion (Sekundärantwort). Gleichzeitig wurden die Tiere unter Evipannarkose mittels Herzkatheter entblutet.

Für die Toleranzexperimente wurden die Immunisierungsbedingungen geändert. In der 1. Injektion erhielten die Kaninchen 3,4 mg $\beta 11$ (oder $\beta 12$), auf molarer Basis entsprechend einer NLK-Menge von 5 mg. In der 2. Injektion wurden 6,8 mg $\beta 11$ (oder $\beta 12$) injiziert, in der 3. Injektion 5 mg NLK mit KFA. Die Tage der Injektionen und der Blutabnahmen sind in Abb. 15. angegeben.

E.11.2. Passive Hämagglutination und Hämagglutination-Inhibition *)

Menschliche Erythrozyten (Blutgruppe 0, Rh pos.) wurden nach Stavitsky (58) gewaschen und bei pH 7,2 mit Tannin behandelt. Nach Entfernen des überschüssigen Tannins wurde eine 2,5%-ige Suspension tannierter Erythrozyten in Boydenpuffer pH 6,4

*) Ich danke FrI. E. Ciora für die Durchführung der Agglutinationsteste.

(0,067 M Phosphatpuffer, 0,15 M NaCl) hergestellt. Die 1%-ige Antigenlösung (10 mg Peptid in 1 ml 2 M KSCN) wurde 1:200 mit Boydenpuffer pH 6,4 verdünnt und mit dem gleichen Volumen der Erythrozytensuspension 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die sensibilisierten Erythrozyten wurden für die Hämagglutination und die Hämagglutination-Inhibition verwendet. Die Titrationsen wurden nach Steffen et al. (59) auf gefelderten Glasplatten durchgeführt.

a) Hämagglutinationstest

Von einem mit 0,15 M NaCl-Lösung geometrisch (1:2) verdünnten Antiserum wurden 0,1 ml pro Feld aufgetropft und mit einem Stäbchen über das Feld verteilt. Dann wurden je Feld 0,05 ml Erythrozytensuspension zugetropft und durch Schwenken der Glasplatte vermischt. Nach 8-10 Min. wurde die jeweilige Agglutination abgelesen. Die Stärke der Agglutination wurde von ++++ bis +, bzw. ± beurteilt.

b) Hämagglutinations-Inhibitionstest

Die Antiseren wurden auf 8 agglutinierende Einheiten (a.u.) verdünnt. Von dem jeweiligen Inhibitor wurde in Röhrchen eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde je Verdünnung ein gleiches Volumen der konstanten Antikörpermeng (8 a.u.) zugegeben und nach Durchmischung 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 0,1 ml auf die Felder der Glasplatte gegeben und 0,05 ml der Suspension sensibilisierter Erythrozyten pro Feld zugetropft. Die Ablesung der auftretenden Agglutination erfolgte nach 8-10 Min.

c) Kontrollen

1. Unbehandelte oder tannierte Erythrozyten mit dem Antiserum
2. Sensibilisierte Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung oder normalen Kaninchenserum

Keine der Kontrollen darf eine Agglutination zeigen.

E.11.3. Trennung von IgM- und IgG-Antikörpern an Sephadex G-200

Die Trennungen an Sephadex G-200 wurden nach Beil et al (60) bei 4°C in 0,15 M NaCl, 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,2, durchgeführt. 1 ml Antiserum wurde auf die Säule (1,6 x 125 cm) aufgetragen, die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen der ersten zwei Peaks (IgM und IgG) wurden durch Ammoniumsulfatfällung (50 % Sättigung) konzentriert. Die Präzipitate wurden in 1 ml normalem Kaninchenserum aufgenommen und gegen phosphatgepufferte Saline pH 7,2 dialysiert.

F. L I T E R A T U R

- (1) Rich A. und Crick F.H., J.Mol.Biol. 3 (1961), 483
- (2) Yonath A. und Traub W., J.Mol.Biol. 43 (1969), 461
- (3) Kühn K., Fietzek P. und Kühn J., Biochem.Z. 344 (1966) 418
- (4) Traub W. und Piez K.A., Adv.Prot.Chem. 25 (1971), 243
- (5) Tanzer M.L. et al., J.Biol.Chem. (im Druck)
- (6) Zimmermann B., Timpl R. und Kühn K., (im Druck)
- (7) Furthmayr H., persönliche Mitteilung
- (8) Butler W.T., Piez K.A. und Bornstein P., Biochem. 6 (1967), 3771
- (9) Fietzek P.P. und Piez K.A., Biochem. 8 (1969), 2129
- (10) Rauterberg J., Fietzek P.P., Rexrodt F.W., Becker U., Stark M. und Kühn K., FEBS Letters 21 (1972), 75
- (11) Fietzek P.P., Rexrodt F.W., Wendt P., Stark M. und Kühn K., Eur.J.Biochem. 30 (1972), 163
- (12) Schmitt F.O. et al., PNAS 51 (1964), 493
- (13) Michaeli D., Martin G.R., Kettman J., Benjamini E., Leung D.Y.K. und Blatt B.A., Science 166 (1969), 1522
- (14) Pontz B., Meigel W., Rauterberg J. und Kühn K., Eur.J.Biochem. 16 (1970), 50
- (15) Timpl R., Fietzek P.P., Furthmayr H., Meigel W. und Kühn K., FEBS Letters 9 (1970), 11
- (16) Furthmayr H., Beil W. und Timpl R., FEBS Letters 12 (1971), 341
- (17) Rauterberg J., Timpl R. und Furthmayr H., Eur.J.Biochem. 27 (1972), 231
- (18) Furthmayr H. und Timpl R., BBRC 47 (1972), 944

- (19) Becker U., Timpl R. und Kühn K., Eur.J.Biochem.
28 (1972), 221
- (20) Pia H.W., Med.Mitt. (Melsungen) 43 (1969), Heft 112
- (21) Jacoby W. et al., Münch.Med.Wschr. 112 (1970), 586
- (22) Pia H.W., Med.Mitt. (Melsungen) 46 (1972), Heft 116
- (23) Lindsley H., Mannik M. und Bornstein P., J.Exp.Med.
133 (1971), 1309
- (24) Pinnell S.R. und Martin G.R., PNAS 61 (1968), 708
- (25) Piez K.A., Eigner E.A. und Lewis M.S., Biochem.
2 (1963), 58
- (26) Bornstein P. und Piez K.A., Biochem. 5 (1966), 3460
- (27) Furthmayr H. und Timpl R., Anal.Biochem. 41 (1971), 510
- (28) Butler W.T. und Cunningham L.W., J.Biol.Chem.
240 (1965), 3449
- (29) Spiro R.G., J.Biol.Chem. 244 (1969), 602
- (30) Miller E.J., Biochem. 10 (1971), 1652
- (31) Bornstein P., Kang A.H. und Piez K.A., Biochem.
5 (1966), 3803
- (32) Rauterberg J. und Kühn K., FEBS Letters 1 (1968), 230
- (33) Stark M., Rauterberg J. und Kühn K., FEBS Letters
13 (1971), 101
- (34) Braun V. und Schroeder W.A., ABB 118 (1967), 241
- (35) Braunitzer G., Chem.Ber. 88 (1955), 2025
- (36) Kang A.H., Bornstein P. und Piez K.A., Biochem.
6 (1967), 788
- (37) Bornstein P., Biochem. 8 (1969), 63
- (38) Becker U. und Timpl R., FEBS Letters 27 (1972), 85
- (39) Miller E.J. und Matukas V.J., PNAS 64 (1969), 1264
- (40) Bailey A.J., Fowler L.J. und Peach C.M., BBRC 35 (1969), 663

- (41) Davis N.R. und Bailey A.J., BBRC 45 (1971), 1416
- (42) Pinnell S.R. et al., New Engl.J.Med. 286 (1972), 1013
- (43) Butler W.T., Science 161 (1968), 796
- (44) Timpl R., Wolff I., Wick G., Furthmayr H. und Steffen C., J.Immunol. 101 (1968), 725
- (45) Onoue K., Tanigaki N., Yagi Y. und Pressman D., Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 120 (1965), 340
- (46) Timpl R., Beil W., Furthmayr H., Meigel W. und Pontz B., Immunol. 21 (1971), 1017
- (47) Bauer D.C., J.Immunol. 91 (1963), 323
- (48) Bauer D.C., Mathies M.J. und Stavitsky A.B., J.Exp.Med. 117 (1963), 889
- (49) Nossal G.J.V., Szenberg A., Ada G.L. und Austin C.M., J.Exp.Med. 119 (1964), 485
- (50) Draper L.R. und Hirata A.A., Immunol. 15 (1968), 23
- (51) Young J.D., Benjamini E., Stewart J.M. und Leung C.Y., Biochem. 6 (1967), 1455
- (52) Crumpton M.J., Law H.D. und Strong R.C., Biochem.J. 116 (1970), 923
- (53) Mitchell B. und Levy J.G., Biochem. 9 (1970), 2762
- (54) Bauminger S., Schechter I. und Sela M., Immunochem. 4 (1967), 169
- (55) Laemmli, Nature 227 (1970), 680
- (56) Rauterberg J. und Kühn K., Eur.J.Biochem. 19 (1971), 398
- (57) Spiro R.G., J.Biol.Chem. 242 (1967), 1915
- (58) Stavitsky A.B., J.Immunol. 72 (1954), 360
- (59) Steffen C., Timpl R. und Wolff I., J.Immunol. 93 (1964), 656
- (60) Beil W., Furthmayr H. und Timpl R., Immunochem. 9 (1972), 779

L E B E N S L A U F

Am 22.4.1943 wurde ich als Sohn des Dr.med. Rudolf Stoltz und seiner Ehefrau Anneliese, geb. DÜx, in Aschersleben (DDR) geboren. Nach 8-jähriger Grundschulzeit und einem Jahr an der Oberschule in Aschersleben übersiedelten wir im Jahre 1958 in die Bundesrepublik. Hier besuchte ich die Niedersächsische Heimschule in Wolfenbüttel bis zum Abitur im Jahre 1963.

Im Sommersemester 1963 begann ich mit dem Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen. Das Vordiplom legte ich im März 1967 ab, die Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung im Januar 1969.

Die Diplomarbeit fertigte ich anschließend unter Leitung von Herrn Prof.Dr. F.A. Anderer am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen an. Das Thema lautete: "Charakterisierung von Immunglobulin A(T) aus Pferdeserum". Das Studium schloß ich im Februar 1970 ab.

Seit Mai 1970 arbeite ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.Kühn an vorliegender Dissertation. Im Juli 1972 wurde die Arbeit experimentell beendet.

Seit Juli 1971 bin ich mit Fräulein Dr. Renate Müller aus Tübingen verheiratet.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

